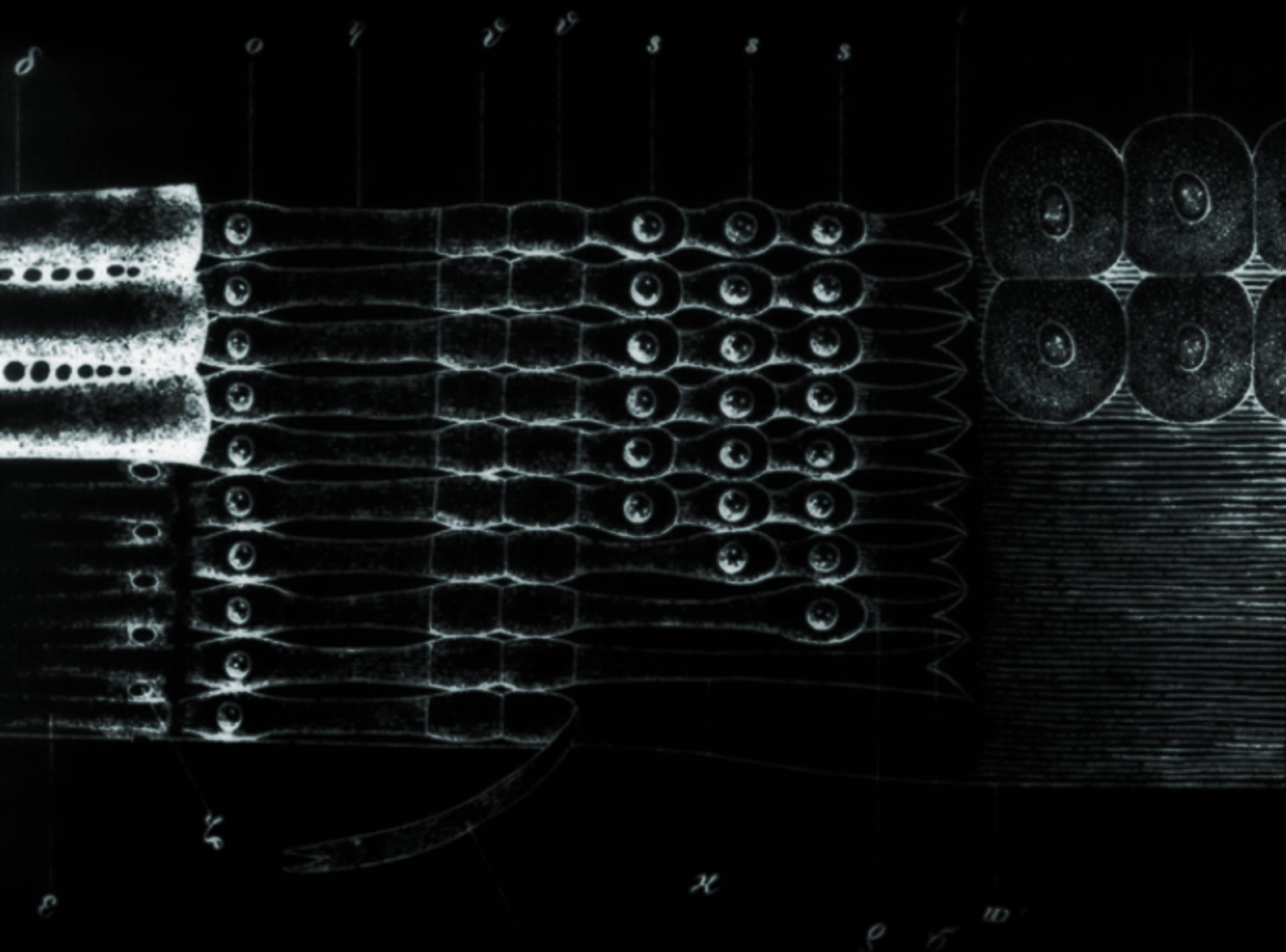


# Implications des cellules non sensorielles dans le développement de l'organe de l'audition murin

Nicolas Thelen





# Implications des cellules non sensorielles dans le développement de l'organe de l'audition murin

Nicolas Thelen

Membres du jury :

Pr. Nadine Antoine, Faculté de Médecine Vétérinaire, ULiège

Dr. Philippe Compère, Faculté des Sciences, ULiège (Secrétaire)

Dr. Benjamin Delprat, INSERM, Montpellier, France

Dr. Brigitte Malgrange, Faculté de Médecine, ULiège

Pr. Denis Nonclercq, Faculté de Médecine et de Pharmacie, UMon

Pr. Jean-Christophe Plumier, Faculté des Sciences, ULiège (Président)

Pr. Marc Thiry, Faculté des Sciences, ULiège (Promoteur)



## Résumé

Chez les mammifères, la perception des sons est rendue possible grâce à un épithélium sensoriel localisé dans l'oreille interne : l'organe de Corti. Celui-ci est constitué par deux types de cellules mécanosensorielles ainsi que par quatre autres types de cellules de soutien organisées en une mosaïque hautement ordonnée s'étalant sur toute la longueur du canal cochléaire. L'audition joue un rôle fondamental dans la survie et la reproduction des mammifères. Chez l'humain, ce sens est primordial dans la communication entre individus, conditionnant à la fois l'apprentissage et l'utilisation des échanges vocaux et influençant les interactions sociales. Dès lors, une perte de l'audition induit inévitablement une baisse de qualité de vie. Lorsque cette perte auditive est provoquée par une dégénérescence des cellules sensorielles de l'organe de Corti, elle est alors incurable ; l'épithélium sensoriel ne pouvant pas se régénérer. Dans ce contexte, la compréhension des différents mécanismes impliqués dans le développement de l'organe de l'audition paraît essentielle dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques visant un rétablissement de la fonction auditive. Grâce à de nouvelles méthodes d'investigation, de grands progrès ont été réalisés ces deux dernières décennies. Néanmoins, de nombreuses questions concernant le développement morphologique, cellulaire et moléculaire de l'organe de l'audition des mammifères restent en suspens.

Dans le présent travail, nous avons étudié le développement de l'organe de Corti avec une attention particulière portée aux cellules de soutien. Nos observations montrent que durant la mise en place de l'organe de Corti, la première cellule qui se distingue n'est pas une cellule sensorielle mais une cellule pilier interne et qu'au sein de cette dernière, la voie de signalisation Notch ne semble pas activée, contrairement à ce qui est observé dans les autres cellules de soutien. Nous mettons également pour la première fois en évidence une transition épithélio-mésenchymateuse partielle ainsi que l'apparition de microtubules à 15 protofilaments au sein des cellules de soutien durant une étape clé du remodelage de l'organe de Corti. De plus, nous montrons que l'acétylation de ces microtubules n'est pas indispensable à leur structure à 15 protofilaments. L'ensemble de nos résultats indiquent l'important rôle que jouent les cellules de soutien durant la mise en place et le remodelage de l'organe de Corti.



## Summary

In mammals, the perception of sound is mediated by an epithelial sensory patch located in the cochlear region of the inner ear, named the organ of Corti. The latter is composed of two hair cells types acting as mechanical receptors, together with four kinds of supporting cells. These cells are arranged in rows to form a highly ordered mosaic running along the length of the snail-like cochlea from base to apex. Hearing is a fundamental adaptation for survival, maintenance, and reproduction. It is also one of the most important sense for human social interactions. Since damaged hair cells do not regenerate in mammals, loss of hair cells inevitably leads to permanent hearing loss and thus, severely degrade the quality of life. Therefore, the mechanism that determines the fate of the cells of the organ of Corti is considered to be an important clinical issue. In the last couple of decades, molecular and genetic techniques have dramatically increased our understanding of the cellular processes that mediate the formation of this remarkable structure. However, many details remain to be determined, especially about the synergy between morphogenesis and molecular events during cell differentiation.

In the present work, we focused on the development of the organ of Corti prior of the onset of hearing with a particular emphasis on the supporting cells. We show that during the initial patterning of the organ of Corti, the first identifiable cells within the prosensory domain are not hair cells but rather inner pillar cells. Additionally, whereas we detect activation of Notch signalling in Deiters cells and outer pillar cells as the organ of Corti develops, it does not appear to be activated in the inner pillar cell. We highlight for the first time a partial epithelial to mesenchymal transition taking place in supporting cells during the morphological remodelling of the organ of Corti. We also revealed the appearance of 15 protofilaments microtubules and  $\beta$ 5-tubulin labelling in specific cell types during key stages of the development of the organ of Corti. Moreover, we show that acetylation of these microtubules is not essential for the formation of the 15 protofilaments microtubule structure. Altogether, our results indicate that supporting cells are playing an important role during the initial patterning and the morphological remodelling of the organ of Corti.



*I love deadlines. I love the whooshing noise they make as they go by.*

— Douglas Adams  
*The Salmon of Doubt*



# Abréviations utilisées

<b>AC</b> : Crête ampullaire antérieure	<b>Gfi1</b> : Growth Factor Independent 1 Transcriptional Repressor
<b>ABP</b> : Actin Binding Protein	<b>Gsk3<math>\beta</math></b> : Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$
<b>Actine G</b> : Actine globulaire	<b>GTP</b> : Guanosine Tri-Phosphate
<b>Actine F</b> : Actine filamenteuse	<b>Hes</b> : Hairy and Enhancer of Split
<b>ADP</b> : Adénosine Di-Phosphate	<b>Hey</b> : Hairy Ears, Y-Linked
<b><math>\alpha</math>-Tat1 ou Atat1</b> : Alpha-tubulin N-acetyltransferase	<b>IC</b> : Cellule Intermédiaire
<b>APC</b> : Adenomatous Polyposis Coli	<b>IHC</b> : Cellule sensorielle interne
<b>Atoh1</b> : Atonal Homolog 1	<b>IL</b> : Niveau d'intensité sonore
<b>ATP</b> : Adénosine Tri-Phosphate	<b>IPC</b> : Cellule pilier interne
<b>Barhl1</b> : BarH Like Homeobox 1	<b>Jag1</b> : Jagged Canonical Notch Ligand 1
<b>BC</b> : Cellule Basale	<b>JAM</b> : Junctional Adhesion Molecule
<b><math>\beta</math>-TrCP</b> : $\beta$ -Transducin Repeat Containing Protein	<b>JNK</b> : Jun N-terminal Kinase
<b>bHLH</b> : basic Helix-Loop-Helix	<b>LC</b> : Crête ampullaire latérale
<b>Bmp4</b> : Bone Morphogenetic Protein 4	<b>LER</b> : Petite crête épithéliale
<b>C</b> : Célérité de propagation de l'onde sonore	<b>Lnfg</b> : Lunatic Fringe
<b>CAM</b> : Cell Adhesion Molecules	<b>Lrp5/6</b> : Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 5/6
<b>cyclines/CDK</b> : Cyclin-Dependent Kinase	<b>MAP</b> : Microtubule Associated Proteins
<b>Cib2</b> : Calcium and integrin-binding family 2	<b>MC</b> : Cellule Marginale
<b>CIP/KIP</b> : CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein	<b>MEC 7/12</b> : MEchanosensory abnormality 7/12
<b>Ck1</b> : Casein Kinase 1	<b>MET</b> : Transition mésenchymo-épithéliale
<b>CVG</b> : Ganglion cochléo-vestibulaire	<b>Mnfg</b> : Manic Fringe
<b>CSL</b> : CBF1/RBPJ/mammal; Suppressor of Hairless/fly; and Lag-1/nematode	<b>MTOC</b> : MicroTubule Organizing Center
<b>Dll1</b> : Delta Like Canonical Notch Ligand 1	<b>Myo6</b> : Myosin 6
<b>Ex</b> : x ème jour embryonnaire	<b>NF-H</b> : Neurofilament Heavy
<b>EGF</b> : Epidermal Growth Factor	<b>NF-L</b> : Neurofilament Light
<b>EMT</b> : Transition épithélio-mésenchymateuse	<b>NF-M</b> : Neurofilament Medium
<b>Eps8</b> : Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8	<b>NICD</b> : Notch IntraCellular Domain
<b>f</b> : Fréquence d'une onde sonore	<b>OHC</b> : Cellule sensorielle externe
<b>FC</b> : Fibrocyte	<b>OPC</b> : Cellule pilier externe
<b>FGF</b> : Facteur de croissance des fibroblastes	<b>PTPRQ</b> : Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type Q
<b>Fzd</b> : Frizzled	<b>P</b> : Pression sonore
<b><math>\gamma</math>TuRC</b> : $\gamma$ -Tubulin Ring Complex	<b>Px</b> : x ème jour post-natal
<b>GDP</b> : Guanosine Di-Phosphate	<b>PAR</b> : Partitioning-defective protein
<b>GER</b> : Grande crête épithéliale	<b>PC</b> : Crête ampullaire postérieure
<b>GFAP</b> : Glial Fibrillary Acidic Protein	<b>PCP</b> : Planar Cell Polarity
	<b>PDGF</b> : Platelet-Derived Growth Factor

**Pou4f3** : POU Class 4 Homeobox 3  
**Prox1** : Prospero Homeobox 1  
**Rac1** : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1  
 $\rho$  : Masse volumique du milieu  
**Rho** : Ras homologous  
**RhoA** : Ras homolog family member A  
**SANS** : Scaffold protein containing ankyrin repeats and SAM domain  
**Shh** : Sonic Hedgehog  
**SM** : Macula sacculaire  
**Sox2** : Sex determining region Y box 2  
**SPL** : Niveau de pression sonore  
**Tau** : Tubulin associated unit  
**TCF/LEF** : T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor

**TGF- $\beta$**  : Transforming Growth Factor  $\beta$   
**TMC1/2** : Transmembrane channel-like protein 1/2  
**ULF** : Unité de Longueur du Filament  
**UM** : Macula utriculaire  
**Ush1g** : Usher syndrome type-1G protein  
**Vasp** : Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein  
**VLGR1** : Very Large G-protein-coupled Receptor  
**Wnt** : Proto-oncogene Wnt (*Wingless & Integration Site*)  
**Z<sup>c</sup>** : Impédance caractéristique du milieu  
**ZNPC** : Zone de non-prolifération cellulaire  
**ZO-1/2** : Zonula Occludens 1/2





# Table des matières

Résumé	ii
Abréviations	vii
Table des matières	xi

## I. Introduction générale

<b>1 Généralités</b>	<b>3</b>
<b>2 Description morphologique de l'oreille des mammifères</b>	<b>5</b>
2.1 L'oreille externe et l'oreille moyenne	5
2.2 L'oreille interne	7
2.2.1 L'appareil vestibulaire	8
2.2.2 La cochlée	10
2.2.2.1 Le canal cochléaire	11
2.2.2.2 L'organe de Corti	14
2.2.2.3 Les cellules de soutien	16
2.2.2.4 Les cellules sensorielles	18
2.2.2.5 Cellules et structures adjacentes à l'organe de Corti	24
2.2.2.6 Le ganglion spiralé et l'innervation de l'organe de Corti	26
<b>3 L'audition chez les mammifères</b>	<b>29</b>
3.1 Notions préliminaires	29
3.1.1 Le son	29
3.1.2 Une définition de l'audition	31
3.2 Fonctionnement de l'audition chez les mammifères	32
3.2.1 La tonotopie cochléaire	35

<b>4</b>	<b>Développement de l'organe de l'audition</b>	<b>39</b>
4.1	L'oreille interne . . . . .	39
4.2	La cochlée et le canal cochléaire . . . . .	40
4.2.1	Le domaine prosensoriel . . . . .	43
4.2.2	La zone de non-prolifération cellulaire . . . . .	44
4.3	L'organe de Corti . . . . .	45
<b>5</b>	<b>Le cytosquelette</b>	<b>51</b>
5.1	Généralités . . . . .	51
5.2	Microfilaments d'actine . . . . .	52
5.3	Les microtubules . . . . .	53
5.4	Les filaments intermédiaires . . . . .	57
<b>6</b>	<b>Transition épithélio-mésenchymateuse</b>	<b>61</b>
6.1	Différences entre cellules épithéliales et cellules mésenchymateuses . . . . .	61
6.1.1	Les épithéliums . . . . .	61
6.1.2	Le mésenchyme . . . . .	64
6.2	Transition épithélio-mésenchymateuse . . . . .	65
<b>7</b>	<b>Objectifs généraux</b>	<b>69</b>

## II. Résultats

<b>8</b>	<b>Identification précoce de la cellule pilier interne durant le développement de l'organe de Corti</b>	<b>75</b>
8.1	Publication . . . . .	78
8.2	Données supplémentaires . . . . .	92
<b>9</b>	<b>Présence d'une transition épithélio-mésenchymateuse partielle durant la morphogénèse post-natale de l'organe de l'audition chez le rat</b>	<b>101</b>
9.1	Publication . . . . .	104
9.2	Données supplémentaires . . . . .	116
<b>10</b>	<b>Dynamique spatio-temporelle des isotypes de tubuline <math>\beta</math> durant le développement de l'organe de Corti</b>	<b>119</b>
10.1	Publication . . . . .	123
10.2	Données supplémentaires . . . . .	137

<b>11 Formation des microtubules à 15 protofilaments durant le développement de la cochlée malgré l'absence d'acétylation de la tubuline</b>	<b>139</b>
11.1 Publication . . . . .	142
11.2 Données supplémentaires . . . . .	151

### **III. Discussion et conclusions**

<b>12 Les deux étapes du développement de l'organe de Corti</b>	<b>155</b>
12.1 Mise en place des cellules de l'organe de Corti . . . . .	155
12.2 Remodelage de l'organe de Corti . . . . .	157
<b>13 Conclusions et perspectives</b>	<b>161</b>

### **IV. Bibliographie**

<b>Bibliographie</b>	<b>167</b>
----------------------	------------

### **V. Annexes**

<b>Bibliographie personnelle</b>	<b>183</b>
----------------------------------	------------



# I | Introduction générale

---

*All you really need to know for the moment is that the universe is a lot more complicated than you might think, even if you start from a position of thinking it's pretty damn complicated in the first place.*

— Douglas Adams



# 1 | Généralités

Le système auditif mammalien est régulièrement considéré comme étant un des plus extraordinaires exemples d'innovations morpho-fonctionnelles apparues chez les vertébrés (Fritzscht *et al.*, 2013; Grothe *et al.*, 2004; Okoruwa *et al.*, 2008). De plus, l'organogenèse de l'oreille interne est également décrite comme étant un des plus remarquables phénomènes de micro-ingénierie de précision ayant lieu dans le sous-embranchement des vertébrés (Swanson *et al.*, 1990). Avec de tels superlatifs, l'audition chez les mammifères ne peut-être qu'un sens très particulier. En effet, malgré sa faible répartition au sein du règne animal<sup>1</sup>, l'audition joue un rôle important dans la détection des proies et des prédateurs ainsi que dans la perpétuation des espèces par la reconnaissance des partenaires sexuels potentiels (Conner et Corcoran, 2012; Montealegre-Z *et al.*, 2012; Petit, 2009a; Yager, 1999). De plus, l'audition occupe une place de premier ordre dans la communication entre individus, conditionnant à la fois l'apprentissage et l'utilisation des échanges vocaux et influençant les interactions sociales (Fritzscht *et al.*, 2007; Petit, 2009a). Le système auditif est également le premier relais par lequel les humains créent, écoutent et apprécient la musique ; un art qui peut d'ailleurs être la source d'une augmentation de l'activité neuronale (Kraus et Chandrasekaran, 2010).

Pourtant, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, il y a dans le monde plus de 360 millions de personnes qui souffrent de déficits auditifs modérés ou profonds. Les conséquences de ces déficits auditifs peuvent être d'ordre fonctionnel, social, émotionnel ou encore économique (World Health Organization, 2013). Chez les mammifères, les surdités de perception résultent d'une atteinte au niveau de la partie auditive de l'oreille interne, la cochlée, et plus rarement du nerf auditif. Ce type de surdité trouve son origine dans un

---

<sup>1</sup>Seuls les vertébrés (à l'exception des agnathes) et certaines sous-classes de l'embranchement des euarthropodes sont dotés d'un véritable sens de l'audition (Fay, 1988; Yager, 1999)

traumatisme sonore, une mutation génétique, un stress oxydatif lié au vieillissement, des maladies infectieuses telles que la méningite ou la rougeole. Elle peut également résulter de l'administration de médicaments ototoxiques tels que les antipaludéens ou les antibiotiques à base d'aminoglycosides (Breuskin *et al.*, 2008; World Health Organization, 2013). Ces atteintes provoquent une dégénérescence des cellules sensorielles de l'organe de l'audition nommé organe de Corti. Cette perte de cellules sensorielles entraîne à son tour la dégénérescence secondaire des neurones du ganglion spiralé, premier relais nerveux de l'audition. Bien que pouvant bénéficier d'une rééducation limitée via l'utilisation de prothèses auditives, ce type de surdité est actuellement incurable. En effet, la destruction des cellules sensorielles de l'organe de Corti ou des neurones du ganglion spiralé est irrémédiable, car contrairement à ce qui est observé chez les oiseaux et chez d'autres vertébrés, aucune régénération de ces tissus n'est actuellement possible chez les mammifères (Breuskin *et al.*, 2008).

Dans ce contexte, la compréhension des différents mécanismes qui sous-tendent le développement de l'organe de l'audition paraît essentielle dans l'élaboration d'éventuelles stratégies thérapeutiques visant une restauration de la fonction auditive. Néanmoins, après plus de 150 ans d'études et malgré les grandes avancées réalisées ces 15 dernières années, de nombreuses questions concernant le développement morphologique, cellulaire et moléculaire de l'organe de l'audition des mammifères restent en suspens (Fritsch *et al.*, 2013; Kelley, 2007).

## 2 | Description morphologique de l'oreille des mammifères

### 2.1 L'oreille externe et l'oreille moyenne

L'oreille des mammifères se compose de trois parties distinctes : l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne (Figure 1). L'oreille externe comporte le pavillon et le conduit auditif externe (Wheater *et al.*, 2001). Le pavillon de l'oreille externe est essentiellement formé de cartilage revêtu de peau mince. Le conjonctif sous-cutané, peu abondant, renferme quelques fibres musculaires striées qui s'insèrent sur le périchondre. Chez l'Homme, cette musculature est peu développée; elle l'est plus chez de nombreux animaux qui possèdent un pavillon orientable<sup>2</sup> facilitant la localisation sonore (Chèvremont, 1980; Fischer et Schäfer, 1991). La paroi du conduit auditif externe est cartilagineuse dans son tiers externe et osseuse ailleurs. La peau qui la tapisse est mince et comporte de nombreux follicules pileux ainsi que des glandes apocrines volumineuses, les glandes à cérumen.

L'oreille moyenne est une cavité remplie d'air, située dans le rocher de l'os temporal et séparée du conduit auditif externe par le tympan. Ce dernier est une membrane constituée d'une partie conjonctive fibreuse comportant deux assises de fibres de collagènes. La face externe de la membrane tympanique est recouverte par un mince épithélium pluristratifié non-malpighien. La face interne est quant à elle recouverte par un épithélium simple, pavimenteux à cubique (Chèvremont, 1980). Les ondes sonores qui heurtent le tympan sont

---

<sup>2</sup>Il est à noter que le pavillon fait défaut chez la plupart des mammifères marins et fouisseurs (Feldhamer, 2007).

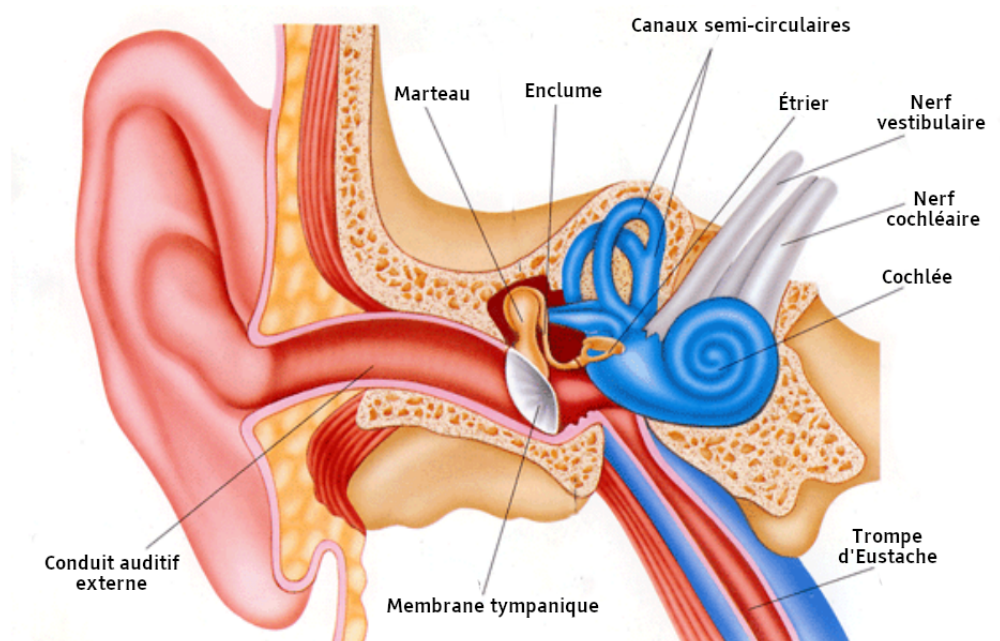


FIGURE 1 – Représentation de l'oreille humaine. Repris et modifié depuis le site web du NIH National Library of Medicine (2019).

converties en vibrations mécaniques et transmises à la chaîne des osselets, formée par trois petits os qui s'articulent entre eux par des articulations synoviales. Les osselets sont le lien entre la membrane tympanique et l'oreille interne. En contact avec le tympan par sa longue apophyse, le marteau est le premier osselet de la chaîne (Mellal, 2010). La tête du marteau est quant à elle en contact avec le deuxième osselet, l'enclume. Ces deux premiers maillons de la chaîne pivotent sur de minuscules ligaments attachés à la paroi de l'oreille moyenne (Wheater *et al.*, 2001). Faisant le lien avec la fenêtre ovale de l'oreille interne, l'étrier est le dernier des osselets. La mobilité des osselets est contrôlée par le muscle tenseur du tympan qui s'insère entre la tête et la longue apophyse du marteau ainsi que par le muscle de l'étrier attaché au niveau de la tête de l'étrier. Ces muscles amortissent les vibrations excessives qui pourraient endommager l'appareil auditif (Purves et Coquery, 2005). La cavité de l'oreille moyenne communique en arrière avec les cavités mastoïdiennes. Elle communique également en avant avec le rhinopharynx par la trompe d'Eustache permettant ainsi l'équilibrage des changements de pression avec le milieu extérieur (Schoffeniels et Moonen, 1993).

## 2.2 L'oreille interne

Enfouie dans la partie pétreuse de l'os temporal et contenant l'organe vestibulo-cochléaire spécialisé dans la perception des sons ainsi que dans le maintien de l'équilibre (Moore et Dalley, 2001), l'oreille interne est constituée d'une structure interconnectée remplie de liquide, le labyrinthe membraneux, engainée dans un dédale de forme complémentaire, le labyrinthe osseux. Les parois de ce dernier sont composées par de l'os plus dense que le reste de la partie pétreuse de l'os temporal formant ainsi la capsule otique.

Le labyrinthe membraneux, à l'intérieur duquel se trouvent les structures sensorielles, est bordé par un épithélium simple et s'insère en plusieurs endroits sur le labyrinthe osseux. Il en reste néanmoins séparé dans sa plus grande partie par des cavités de tailles irrégulières emplies d'un fluide, la périlymphe, dont la composition est très proche de celle du liquide céphalo-rachidien<sup>3</sup> (Chèvremont, 1980; Ferrary et Sterkers, 1998; Wheeler *et al.*, 2001).

Un fluide riche en potassium (140-170 mM) et pratiquement dépourvu de sodium (1-10 mM), l'endolymphe<sup>4</sup>, est contenu au sein du système clos formé par le labyrinthe membraneux (Couloigner *et al.*, 2004; Ferrary et Sterkers, 1998). Logé dans un dédoublement de la dure-mère de la fosse cérébrale postérieure, le sac endolymphatique relie le labyrinthe membraneux par le canal endolymphatique qui chemine dans l'os temporal à l'intérieur d'un canalicule osseux appelé aqueduc vestibulaire (Couloigner *et al.*, 2004). La lumière du sac endolymphatique est bordée par un épithélium simple prismatique dont les caractéristiques confirmeraient une implication dans l'homéostasie de l'endolymphe cochléo-vestibulaire.

Le labyrinthe osseux comporte trois régions principales : le vestibule, les canaux semi-circulaires et le limaçon ou cochlée (Figure 2). Latéralement, le vestibule est séparé de la cavité de l'oreille moyenne par une mince lamelle osseuse présentant deux ouvertures : la fenêtre ovale et la fenêtre ronde. La fenêtre ovale est fermée par la base de l'étrier entouré par un ligament annulaire. La fenêtre ronde est, quant à elle, obturée par une membrane de constitution analogue au tympan, fréquemment nommée membrane tympanique secondaire.

---

<sup>3</sup>L'espace périmembraneux communique directement avec l'espace sous-arachnoïdien par l'aqueduc cochléaire (Moore et Dalley, 2001)

<sup>4</sup>La composition ionique de l'endolymphe varie en fonction de sa localisation dans l'oreille interne (Couloigner *et al.*, 2004; Ferrary et Sterkers, 1998)

Les canaux semi-circulaires, au nombre de trois et disposés de manière orthogonale dans trois plans différents de l'espace, s'insèrent en arrière du vestibule. La cochlée s'en détache en avant et, chez la plupart des mammifères, une proéminence provoquée par son premier tour de spire est visible dans la cavité de l'oreille moyenne<sup>5</sup> (Chèvremont, 1980; Junqueira *et al.*, 1995; Raphael et Altschuler, 2003; Wheater *et al.*, 2001).

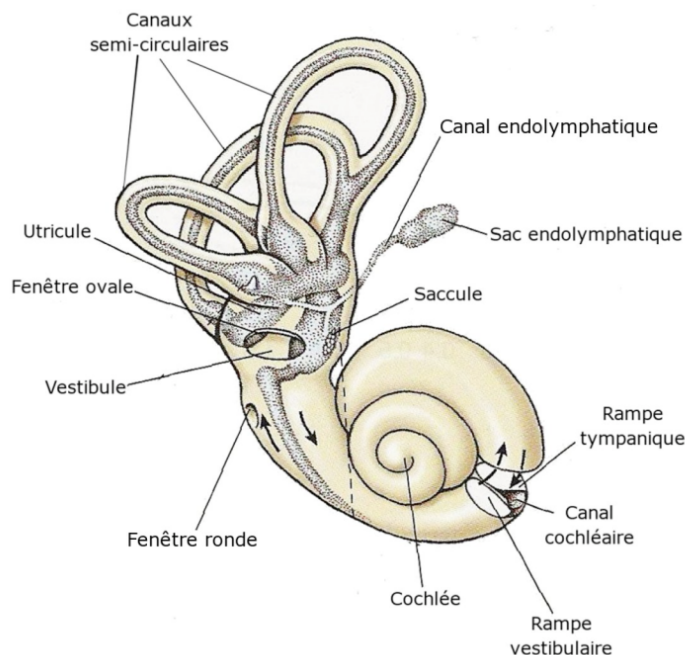


FIGURE 2 – Représentation de l'oreille interne des mammifères. Repris et modifié depuis Randall *et al.* (1997).

### 2.2.1 L'appareil vestibulaire

L'appareil vestibulaire, siège de l'organe de l'équilibre, est constitué de plusieurs éléments sensoriels, à savoir le saccule, l'utricule et les trois crêtes ampullaires (Figure 3).

Le saccule et l'utricule sont deux régions dilatées du labyrinthe membraneux, situées dans le vestibule. Un épithélium simple, cubique à pavimenteux, en tapisse la face interne excepté en deux endroits où l'épithélium s'épaissit pour former les macules de l'utricule et du saccule. Les macules sont des plages ovoïdes de 2 à 3 mm de long chez l'Homme et

<sup>5</sup>Chez les rongeurs, c'est toute la cochlée qui provoque une proéminence visible dans la cavité de l'oreille moyenne (Raphael et Altschuler, 2003)

orientées perpendiculairement l'une à l'autre. Elles possèdent un épithélium composé par deux populations cellulaires : les cellules de soutien et les cellules sensorielles (Chèvremont, 1980; Junqueira *et al.*, 1995).

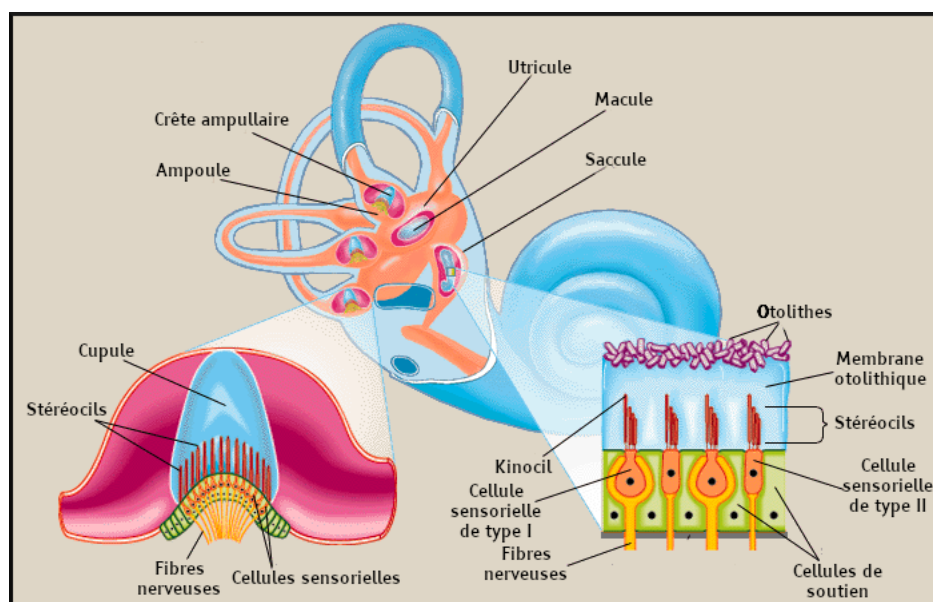


FIGURE 3 – Représentation de l'appareil vestibulaire. Repris et modifié depuis la page web de Encyclopedia Britannica (2019).

Les cellules de soutien sont en contact avec la membrane basale et une grande partie d'entre elles s'insinue jusqu'à la surface de l'épithélium. Leur disposition est telle que les cellules sensorielles sont régulièrement séparées l'une de l'autre par une cellule de soutien.

Les cellules sensorielles mécanoréceptrices occupent la partie supérieure de l'épithélium. Ces cellules se caractérisent par le fait qu'elles portent, à leur pôle apical, un cil unique, le kinocil, ainsi qu'une touffe de 40 à 80 longs stéréocils<sup>6</sup>. Connectées aux projections dendritiques des neurones vestibulaires, elles convertissent les informations positionnelles en potentiel d'action (Chèvremont, 1980; Wheater *et al.*, 2001). Deux types de cellules sensorielles sont distingués : les cellules sensorielles de type I ont une forme de bulbe et leur base est recouverte par un feutrage de prolongements dendritiques de neurones sensoriels afférents ; les cellules sensorielles de type II sont fusiformes et présentent seulement de petits prolongements dendritiques à leur base (Bagger-Sjöbäck *et al.*, 1974). Il existe également d'autres différences

<sup>6</sup>Toutes les cellules sensorielles de l'oreille interne sont organisées selon un même patron ; leur structure sera décrite plus extensivement au chapitre "2.2.2.4 Les cellules sensorielles"

entre les deux types de cellules sensorielles tels le nombre de stéréocils présents au pôle apical, la géométrie de la touffe de stéréocils ou encore la conductance des canaux potassium (Moravec et Peterson, 2004; Peterson *et al.*, 1996; Rüsç *et al.*, 1998).

La surface des macules est recouverte par une couche relativement épaisse d'une substance glycoprotéique gélatineuse dans laquelle le kinocil et les stéréocils des cellules sensorielles pénètrent. Cette couche glycoprotéique contient une multitude de corps cristallins, les otolithes, petits cristaux principalement composés de carbonate de calcium (Wheater *et al.*, 2001). Les macules du saccule et de l'utricule sont respectivement responsables de la perception des accélérations linéaires verticale et horizontale (Chèvremont, 1980; Junqueira *et al.*, 1995).

Les crêtes ampullaires se situent au niveau de chaque ampoule des canaux semi-circulaires. Ce sont des structures épithéliales allongées situées sur un repli de tissu conjonctif. Elles sont orientées perpendiculairement à la direction du flux de l'endolymphe provenant des canaux semi-circulaires (Wheater *et al.*, 2001). Comme les macules, les crêtes ampullaires sont composées par des cellules de soutien et par des cellules sensorielles. Les stéréocils et kinocils des cellules sensorielles sont également enchâssés dans une couche glycoprotéique, haute et de forme conique en section transversale, formant la cupule. Contrairement aux macules, les cupules ne contiennent pas d'otolithes. Les crêtes ampullaires sont responsables de la perception des accélérations angulaires (Chèvremont, 1980; Junqueira *et al.*, 1995).

### 2.2.2 La cochlée

La cochlée est l'organe de l'audition des mammifères. Il s'agit d'une structure hélicoïdale enroulée autour d'un axe central nommé columelle ou modiolus, un cône d'os spongieux en forme de tire-bouchon dans lequel pénètrent de nombreux vaisseaux sanguins ainsi que des fibres du nerf cochléaire (Chèvremont, 1980). Autour de cet axe osseux, s'enroule le tube cochléaire (Wheater *et al.*, 2001). Ce dernier, qui comprend également un segment basal non-enroulé, est cloisonné par deux membranes et est ainsi subdivisé en trois canaux : la rampe vestibulaire (*scala vestibulari*) séparée du canal cochléaire (*scala media*) par la membrane de Reissner et la rampe tympanique (*scala tympani*), elle-même séparée du canal cochléaire par

la membrane basilaire (Figure 4).

La rampe vestibulaire et la rampe tympanique font, toutes les deux, partie du labyrinthe osseux et sont donc emplies de périlymphe (Junqueira *et al.*, 1995). La rampe vestibulaire est en continuité avec le vestibule au niveau de la base de la cochlée et communique avec la rampe tympanique par une petite ouverture se trouvant au sommet de la spirale cochléaire, l'hélicotrème. La rampe tympanique se termine quant à elle au niveau de la seconde membrane tympanique qui recouvre la fenêtre ronde.

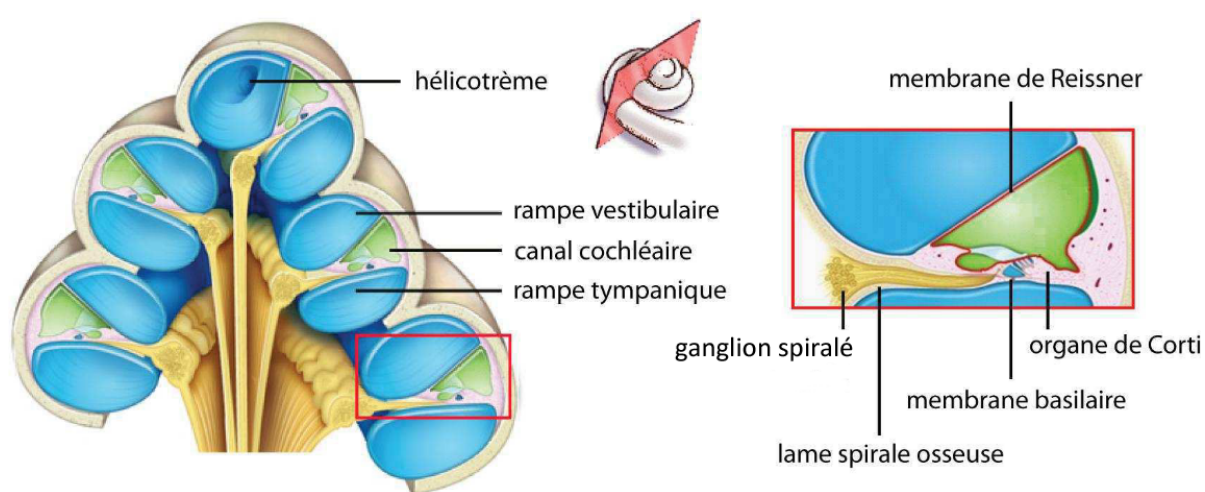


FIGURE 4 – Représentation d'une coupe sagittale dans la cochlée. À droite, un agrandissement centré sur le canal cochléaire (en vert). Repris et modifié depuis le site web du Voyage au centre de l'audition (2016).

### 2.2.2.1 Le canal cochléaire

Le canal cochléaire représente le labyrinthe membraneux de la cochlée. Ce canal contient le liquide endolymphatique qui, dans la cochlée, possède un haut potentiel électrique d'environ +80 mV (Forge et Wright, 2002). Ce canal présente une section triangulaire dont le sommet aigu touche la columelle. La membrane de Reissner en forme l'hypoténuse et le mur latéral, le petit côté. Le plancher de la rampe cochléaire est composé de la lame spirale, une courte lame osseuse qui s'appuie sur la columelle, et de la membrane basilaire (Chèvremont, 1980).

La membrane de Reissner qui sépare la rampe vestibulaire du canal cochléaire, est constituée de deux couches de cellules très aplaties. En regard de la rampe vestibulaire,

un mésothélium très mince et discontinu repose sur une fine couche de tissu conjonctif. Ce dernier est séparé de l'épithélium simple pavimenteux du canal cochléaire par une lame basale (Coujard et Poirier, 1980).

Le mur latéral se compose de la strie vasculaire, de la proéminence spirale, et du ligament spiral. La strie vasculaire, qui joue un rôle important dans l'absorption et la sécrétion du liquide endolymphatique, occupe les trois-quarts supérieurs du mur latéral. Cette structure épithéliale complexe et riche en vaisseaux sanguins est composée de plusieurs types cellulaires : les cellules marginales, les cellules intermédiaires et les cellules basales (Kikuchi et Hilding, 1966; Kimura et Schuknecht, 1970) (Figure 5).

Les cellules marginales forment la couche en contact direct avec l'endolymphe et les capillaires sanguins. Liées les unes aux autres par des complexes de jonctions serrées, ces cellules émettent également des prolongements cytoplasmiques, riches en mitochondries, qui s'interpénètrent avec les autres types cellulaires de la strie vasculaire (Coujard et Poirier, 1980; Kimura et Schuknecht, 1970; Souter et Forge, 1998). Sous le pôle basal des cellules marginales, une membrane basale incomplète et parcellaire est observée, notamment au niveau de leurs contacts avec les capillaires sanguins (Kikuchi et Hilding, 1966; Kimura et Schuknecht, 1970).

Les cellules intermédiaires sont des cellules de type mélanocytaire et forment une couche discontinue située latéralement aux cellules marginales (Hilding et Ginzberg, 1977; Raphael et Altschuler, 2003). Parmi ces cellules qui dérivent probablement des crêtes neurales, deux sous-types sont distingués : les cellules claires et les cellules sombres (Cable et Steel, 1991; Conlee *et al.*, 1989). Les cellules claires possèdent l'apparence typique des mélanocytes tandis que les cellules sombres sont quant à elles un type cellulaire hybride, partageant à la fois des caractéristiques de mélanocytes et de macrophages (Zhang *et al.*, 2012). La morphologie ultrastructurale de ces cellules sombres, qui sont localisées uniquement autour des capillaires sanguins, semble indiquer qu'elles représentent un stade de différenciation plus avancé des cellules claires (Cable et Steel, 1991).

Les cellules basales constituent les strates les plus profondes de la strie vasculaire. Ces cellules relativement plates forment plusieurs couches et sont liées entre elles par de nombreux complexes de jonctions serrées, séparant ainsi les compartiments extracellulaires de la strie

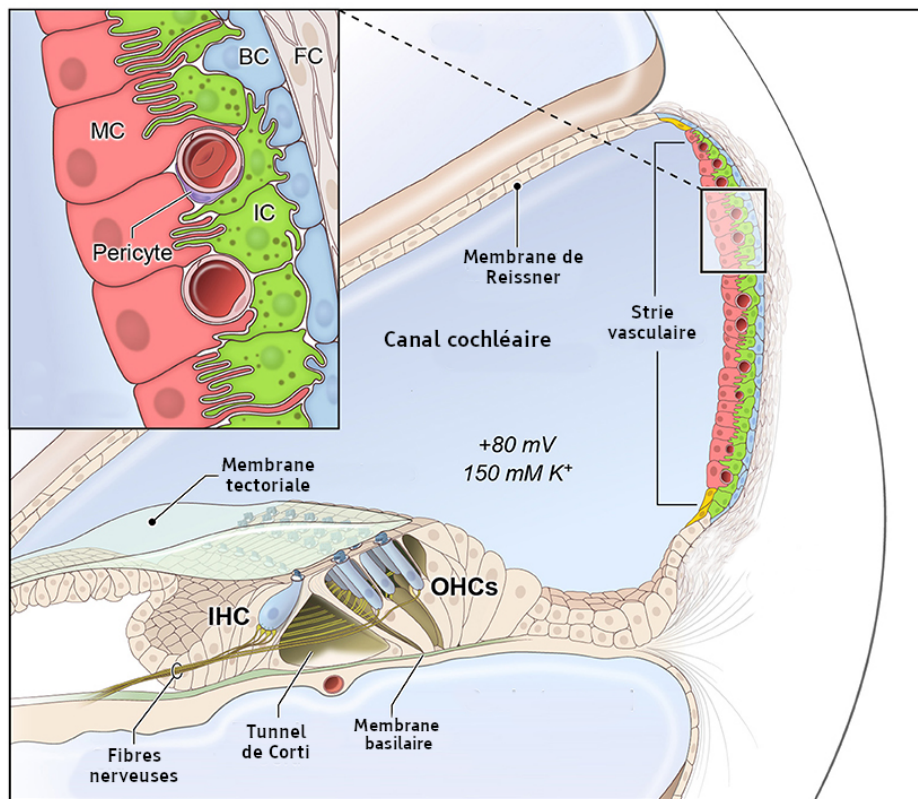


FIGURE 5 – Représentation de la strie vasculaire, située dans la partie externe du canal cochléaire. MC : cellule marginale, IC : cellule intermédiaire, BC : cellule basale, FC : fibrocyte, IHC : cellule sensorielle interne, OHC : cellule sensorielle externe. Repris et modifié depuis Gu *et al.* (2021)

vasculaire et du ligament spiral (Kimura et Schuknecht, 1970; Trowe *et al.*, 2008).

Séparant le canal cochléaire de la rampe tympanique, la membrane basilaire relie la lame spirale au ligament spirale (Raphael et Altschuler, 2003). La membrane basilaire est un assemblage complexe de cellules mésothéliales et de tissu conjonctif constitué par des protéines de la matrice extracellulaire ainsi que par des fibres orientées radialement par rapport à l'axe de la columelle (Coujard et Poirier, 1980; Petit, 2003). Des glycoprotéines telles que la fibronectine et la tenascine ont été détectées au sein de cette membrane, ainsi que des fibres de collagène de type II, IV et XI (Cosgrove et Rodgers, 1997; Cosgrove *et al.*, 1996; Dreiling *et al.*, 2002; Santi *et al.*, 1989; Swartz et Santi, 1999; Thalmann, 1993). La largeur et l'épaisseur de la membrane basilaire augmentent de façon continue le long du canal cochléaire en suivant un gradient base-apex (Dulguerov et Remacle, 2005). Sa rigidité, quant à elle, décroît en suivant le même gradient (Petit, 2003). Deux zones membranaires sont distinguées : la zone arquée

(*zona arcuata*) couvrant le tiers interne et insérée sur la lame spirale, est rigide, peu mobile et est perforée par de petites ouvertures, collectivement nommée *l'habelluna perforata* ; la zone pectinée (*zona pectinata*) compose les deux tiers restants et est rattachée au ligament spiral. À l'inverse de la zone arquée, la zone pectinée est quant à elle très mobile (Coujard et Poirier, 1980; Petit, 2003; Raphael et Altschuler, 2003). Une différence supplémentaire entre les deux zones qui composent la membrane basilaire est la présence d'une petite artériole au sein de la zone arquée nommée vaisseau spiral (Axelsson, 1988; Carraro *et al.*, 2013; Raphael et Altschuler, 2003).

#### 2.2.2.2 L'organe de Corti

Positionné sur la partie médiane de la membrane basilaire, l'organe de Corti représente le véritable épithélium sensoriel auditif de la cochlée (Corti, 1851; Kölliker, 1854). Il s'agit d'une structure complexe dans laquelle toutes les cellules se distribuent suivant un arrangement précis qui se retrouve sur toute la longueur de l'organe, adoptant une régularité rarement atteinte chez les vertébrés (Kelley et Bianchi, 2001). Cet arrangement cellulaire est constitué par deux mosaïques épithéliales composées de deux types cellulaires principaux : les cellules sensorielles et des cellules de soutien. Parmi ces deux grands types cellulaires qui composent l'organe auditif, il est possible de distinguer quatre sortes de cellules de soutien : les cellules piliers internes et externes, les cellules de soutien internes (*cellules phalangées internes*) et les cellules de soutien externes (*cellules de Deiters*), et deux types de cellules sensorielles : les cellules sensorielles internes et externes, responsables de la détection des sons (Raphael et Altschuler, 2003) (Figure 6).

Les deux mosaïques épithéliales sont inclinées l'une vers l'autre et délimitent un espace intercellulaire à section triangulaire localisé juste au-dessus du vaisseau spiral (Chèvremont, 1980; Raphael et Altschuler, 2003). Ce dernier, nommé tunnel de Corti, est le point de démarcation des parties internes (vers la columelle) et externes (vers le mur latéral) du canal cochléaire (Raphael et Altschuler, 2003). Communiquant avec le tunnel de Corti, d'autres vastes espaces intercellulaires, les espaces de Nuel, entourent les cellules sensorielles externes (Chèvremont, 1980). Tous ces espaces intercommunicants sont remplis d'un fluide nommé

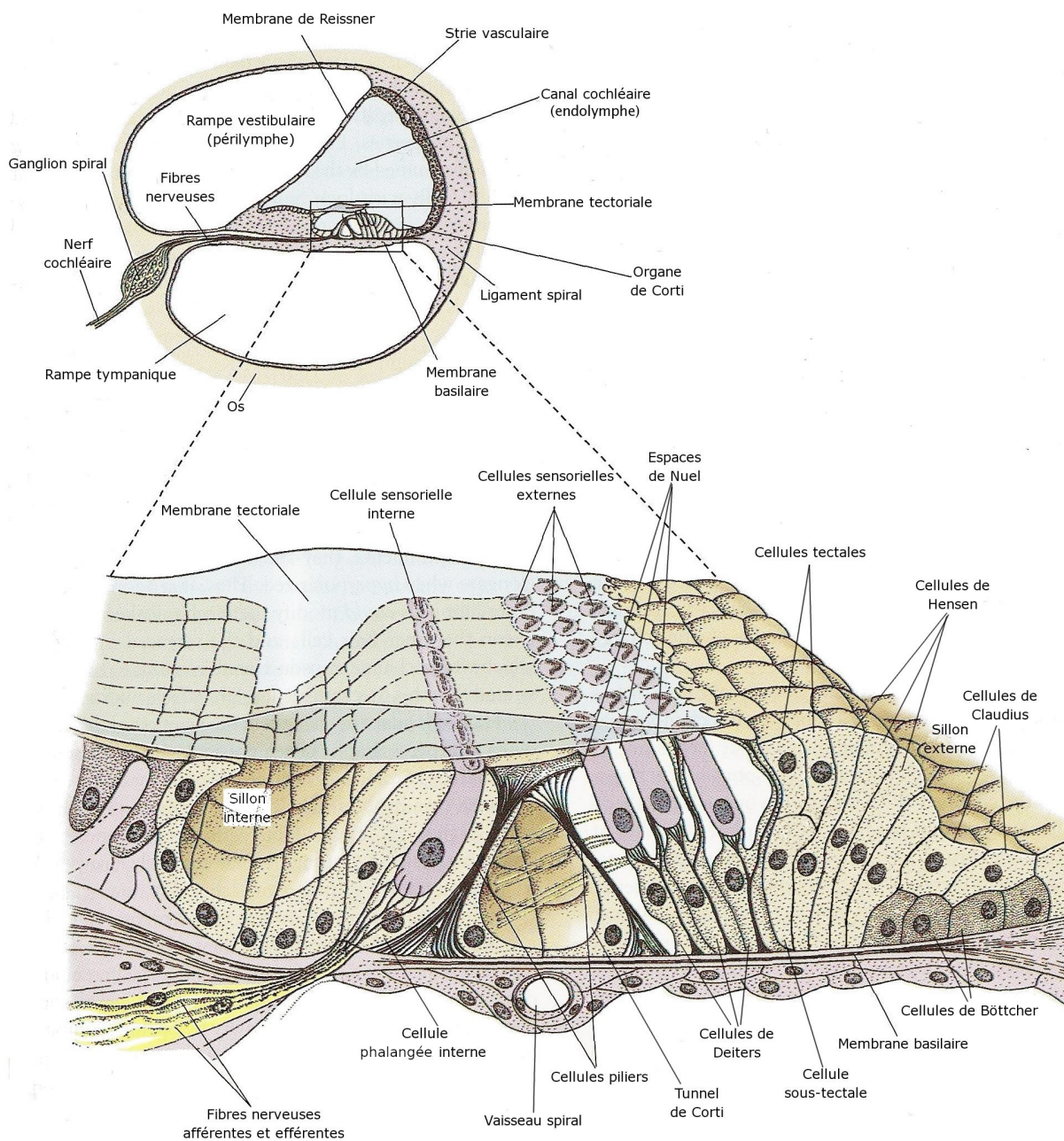


FIGURE 6 – Représentation du canal cochléaire (en haut), de l'organe de Corti ainsi que de ses cellules et structures adjacentes (en bas). Repris et modifié depuis Randall *et al.* (1997).

cortilymphe aux caractéristiques proches de la périlymphe (Engström, 1960). Le tunnel de Corti et les espaces de Nuel sont fermés à la surface de l'organe de Corti par la membrane réticulaire<sup>7</sup> (*membrana reticularis*). Celle-ci est formée par les pôles apicaux des cellules sensorielles et des cellules de soutien unis entre eux par un ensemble élaboré de jonctions serrées (Raphael et Altschuler, 2003).

### 2.2.2.3 Les cellules de soutien

En contact avec la membrane basilaire, les cellules de soutien de l'organe de Corti sont des cellules épithéliales hautement différenciées ; chacune possède des caractéristiques morphologiques distinctes (Raphael et Altschuler, 2003). Ces cellules sont liées les unes aux autres et avec les cellules sensorielles par des jonctions serrées ainsi que par des jonctions adhérentes ; des jonctions communicantes sont également présentes au niveau de leur membrane cytoplasmique (Wan *et al.*, 2013). En plus de leur fonction de support structurel, ces cellules jouent un rôle important dans la régulation de l'environnement ionique de l'organe de Corti (Kikuchi *et al.*, 2000; Spicer *et al.*, 2000; Wan *et al.*, 2013).

### *Les cellules piliers*

Les cellules piliers sont des cellules de soutien spécialisées qui bordent et forment le tunnel de Corti (Junqueira *et al.*, 1995). Ces cellules possèdent un noyau situé en position basale et elles se prolongent par une fine extension cytoplasmique légèrement dilatée à leur pôle apical. Leur caractéristique cytoplasmique essentielle est la présence sur toute leur longueur d'un assemblage organisé de plusieurs centaines de microfilaments d'actine et de microtubules<sup>8</sup> (Tolomeo et Holley, 1997; Tucker *et al.*, 1993). De fins ponts transversaux unissent ces filaments d'actine et ces microtubules qui, au niveau de la tête et de la base des cellules piliers, s'épanouissent en éventail. De plus, ces microtubules sont formés par 15 protofilaments au lieu des 13 habituellement observés chez les mammifères (Angelborg et Engström, 1972). Ce cytosquelette très organisé confère aux cellules piliers une rigidité exceptionnelle (Tolomeo et

---

<sup>7</sup>Également parfois appelée lame réticulaire (*lamina reticularis*) (Raphael et Altschuler, 2003)

<sup>8</sup>Le nombre de microtubules varie en fonction de l'espèce et de la localisation des cellules piliers au sein de la cochlée (Angelborg et Engström, 1972)

Holley, 1997; Zagadou *et al.*, 2014b).

Les cellules piliers internes, en contact étroit les unes avec les autres sur toute leur hauteur, forment un mur continu séparant le tunnel de Corti de la partie interne de l'organe de l'audition. Les cellules piliers internes et externes ne se touchent que par leurs extrémités et la tête de chaque cellule pilier externe vient s'encastrier sous celle d'une cellule pilier interne. Quant aux cellules piliers externes, seuls leurs niveaux apical et basal sont en contact, constituant sur la paroi externe du tunnel de Corti de véritables arcades par lesquelles le tunnel communique largement avec les espaces de Nuel (Chèvremont, 1980).

### ***Les cellules de Deiters***

Les cellules de Deiters sont de véritables cellules de soutien pour les cellules sensorielles externes (Coujard et Poirier, 1980). Ces cellules sont disposées en trois à cinq rangées le long du canal cochléaire (Wheater *et al.*, 2001). Leur cytoplasme contient un abondant réticulum endoplasmique rugueux et leur corps se termine à l'apex par une cupule où viendront se loger le pôle basal d'une cellule sensorielle externe et les terminaisons nerveuses correspondantes. De la cupule part dans les espaces de Nuel un prolongement filiforme isolé correspondant à un assemblage organisé de filaments d'actine et de microtubules identique à celui des cellules piliers ; il se termine par une phalange aplatie surmontée d'une touffe de microvillosités (Chèvremont, 1980; Raphael et Altschuler, 2003). Cette phalange aplatie, partie intégrante de la membrane réticulaire, n'est pas en contact avec la cellule sensorielle externe pour laquelle la cellule de Deiters fait office de soutien. En effet, le prolongement filiforme de la cellule de Deiters est orienté obliquement en direction du mur latéral et de la partie apicale du canal cochléaire (Lim, 1986).

### ***Les cellules phalangées internes***

Deux rangées de cellules phalangées internes entourent et supportent les cellules sensorielles internes. Ces hautes cellules de soutien en forme de flacon séparent les cellules sensorielles internes d'entre elles et des cellules piliers internes. Seule la rangée la plus interne de cellules phalangées atteint la surface apicale de l'organe de Corti (Chèvremont, 1980; Krstic,

1991).

#### 2.2.2.4 Les cellules sensorielles

Les cellules sensorielles de l'organe de Corti sont les cellules responsables de la transduction des ondes sonores en signaux électrochimiques. Ces cellules ne sont pas en contact avec la membrane basilaire et présentent au niveau de leur pôle basal des terminaisons nerveuses afférentes et efférentes (Chèvremon, 1980). Une plaque cuticulaire se situe au niveau de leur pôle apical qui est la seule partie de la cellule à être en contact avec l'endolymphe ; le reste de la cellule est localisé dans le compartiment cortilymphatique. De cette plaque cuticulaire, constituée par des microfilaments d'actine à la polarité hétérogène, émergent au moins trois rangées de microvillosités modifiées, les stéréocils, disposées par taille croissante. Les stéréocils sont des projections de la membrane plasmique<sup>9</sup> d'une épaisseur d'approximativement 250 nm et dont le support mécanique est assuré par des microfilaments d'actine liés entre eux par des protéines telle que la fimbrine (Bohne et Carr, 1985; Flock et Cheung, 1977; Pack et Slepecky, 1995; Sobin et Flock, 1983; Zine *et al.*, 1995). Le kinocil, présent au pôle apical des cellules sensorielles de l'appareil vestibulaire, est absent des cellules sensorielles auditives matures (Furness et Hackney, 2006).

La caractéristique fondamentale des stéréocils des cellules sensorielles de l'oreille interne est la présence de filaments extracellulaires qui les lient entre eux : de nombreux liens latéraux ou "*lateral-links*" ainsi que des liens apicaux ou "*tip-links*", soupçonnés d'être directement impliqués dans la mécano-transduction (Hackney et Furness, 2013; Pickles *et al.*, 1984)(Figure 7.

Les "*lateral-links*" sont des liaisons entre stéréocils voisins. Ils sont responsables de la cohésion de l'ensemble de stéréocils permettant ainsi un mouvement homogène de la touffe. Ceci a pour effet de maximiser la transduction mécano-électrique de la cellule (Kozlov *et al.*, 2007). Ces "*lateral-links*" sont classés en fonction de leur emplacement le long des stéréocils. Ainsi, sont distingués les "*top-connectors*", les "*shaft-connectors*", les "*ankle-links*" et, lorsque le kinocil est présent, les "*kinociliary-links*". Leur répartition ainsi que leur composition sont

---

<sup>9</sup>La longueur des stéréocils varie d'une espèce à l'autre et selon un gradient cochléaire base-apex ; elle dépend de la fréquence des ondes sonores détectées (Pujol *et al.*, 1998).

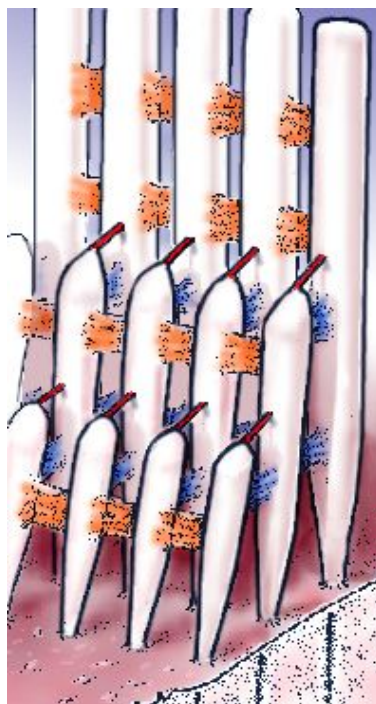


FIGURE 7 – Représentation des stéréocils des cellules sensorielles et de la disposition des "lateral-links" (en bleu et en orange) et des "tip-links" (en rouge). Repris depuis le site web Voyage au centre de l'audition (2016).

sujettes à variation en fonction du type de cellule sensorielle, de sa localisation au sein de l'épithélium ainsi que de son stade de développement (Furness et Hackney, 2006; Hackney et Furness, 2013). Parmi les molécules qui composent les "lateral-links", la stéréociline est la plus connue (Verpy *et al.*, 2001, 2011). D'autres protéines participent également à leur formation telles que PTPRQ (*Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type Q*), VLGR1 (*Very Large G-protein-coupled Receptor*), l'usherine, la protocadhérine 15 ou encore la cadhérine 23 (Hackney et Furness, 2013; McGee *et al.*, 2006; Michalski *et al.*, 2007; Michel *et al.*, 2005; Nayak *et al.*, 2011; Senften, 2006).

Découvert en 1984 par Pickles (Pickles *et al.*, 1984), les "tip-links" sont des liaisons entre la pointe apicale d'un stéréocilium et un stéréocilium de taille supérieure de la rangée adjacente. Ces liens seraient composés par des dimères de protocadhérine 15 associés en hélice ainsi que par des

dimères de cadhérine 23 également associés en hélice (Kazmierczak *et al.*, 2007). Observées en microscopie électronique à transmission, les points d'ancrage des "tip-links" sur les stéréocils apparaissent denses aux électrons. Ces points d'ancrage sont constitués par des protéines telles que la calmoduline, la whirline, la myosine 1c, la myosine XVa, la myosine VIIa, la twinfiline, Eps8 (*Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8*), Ush1g<sup>10</sup> (*Usher syndrome type-1G protein*) et l'harmonine-b (Belyantseva *et al.*, 2003; Delprat *et al.*, 2005; Furness *et al.*, 2002; Grillet *et al.*, 2009; Hackney et Furness, 2013; Rzadzinska *et al.*, 2009; Steyger *et al.*, 1998; Zampini *et al.*, 2011) (Figure 8).

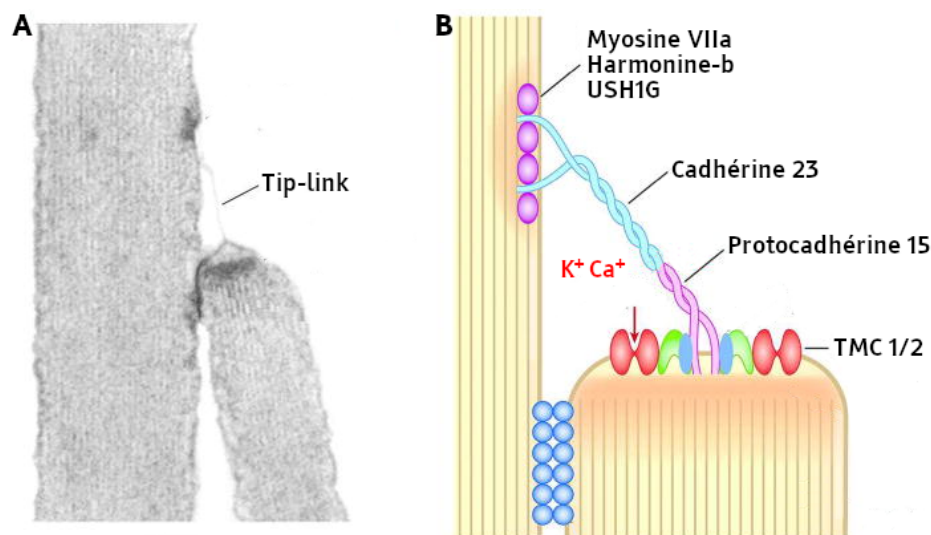


FIGURE 8 – Représentation des "tip-links" des cellules sensorielles. A : photographie en microscopie électronique à transmission de la position d'un "tip-link" au sommet d'un stéréocil. Barre : 0,2  $\mu\text{m}$ . B : Schéma illustrant la composition moléculaire d'un "tip-link". Repris et modifié depuis Fettiplace et Hackney (2006).

Plusieurs études ont suggéré la présence de canaux de transduction mécano-électriques à proximité des points d'ancrage localisés à l'extrémité apicale des rangées de stéréocils les plus courts. Les canaux de transduction mécano-électriques sont en partie formés par les protéines transmembranaires TMC1/2 (*Transmembrane channel-like protein - 1 / -2*) associées à CIB2 (Giese *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2013). Des études effectuées en microscopie électronique à transmission et utilisant une méthode de détection indirecte, ont localisé ces canaux de

<sup>10</sup>Également nommée SANS (*Scaffold protein containing ankyrin repeats and SAM domain*)

transduction mécano-électriques à une distance comprise entre 50 et 100 nm par rapport aux points d'ancrage des "tip-links" (Furness *et al.*, 1996; Hackney *et al.*, 1992; Hackney et Furness, 2013). Des études électrophysiologiques ainsi qu'une imagerie calcique à haute vitesse semblent indiquer la présence d'un ou deux canaux de transduction mécano-électriques par stéréocils (Beurg *et al.*, 2006, 2009).

Durant le développement des cellules sensorielles, l'apparition des "tip-links" concorde avec l'émergence de la transduction (Géléoc et Holt, 2003). Il a également été montré que la destruction des "tip-links" abolissait la transduction et que celle-ci n'était rétablie qu'une fois ces liens régénérés (Assad *et al.*, 1991; Zhao *et al.*, 1996). De plus, de récentes études suggèrent que TMC1/2 interagiraient avec la protocadhérine 15 des "tip-links" (Maeda *et al.*, 2014). Cet ensemble de données fournissent ainsi de sérieux indices associant les "tip-links" et l'ouverture des canaux de transduction mécano-électriques (Hackney et Furness, 2013).

### ***Les cellules sensorielles internes***

Au nombre d'environ 3500 chez l'Homme, les cellules sensorielles internes sont piriformes, possèdent un noyau en position centrale et sont réparties sur une seule rangée le long du canal cochléaire, au-dessus de la zone arquée de la membrane basilaire (Figure 9). Leurs stéréocils forment une courbe très ouverte à concavité tournée en dedans vers la columelle (Figure 10). Les faces latérales des cellules sensorielles sont en contact avec les cellules phalangées internes ; elle sont également en contact avec les cellules piliers internes au niveau de leur pôle apical.

Une fois mature, ces cellules ne présentent ni jonction communicante ni desmosome<sup>11</sup> (Gulley et Reese, 1976). La base des cellules sensorielles internes est entourée par environ une dizaine de complexes synaptiques constitués par les dendrites afférentes des fibres auditives, elles-mêmes contactées par des terminaisons efférentes. Ces fibres nerveuses pénètrent dans l'organe de Corti par l'*habenula perforata* (Chèvremont, 1980; Coujard et Poirier, 1980). Les synapses entre les cellules sensorielles internes et les fibres afférentes sont caractérisées par un corps présynaptique : le ruban synaptique. Ce dernier apparaît dense aux électrons en microscopie électronique à transmission et est entouré par des vésicules contenant le

---

<sup>11</sup>Ceci est en accord avec l'absence de cytokératine, fait inhabituel pour des cellules épithéliales (Anniko *et al.*, 1987; Kuijpers *et al.*, 1992).

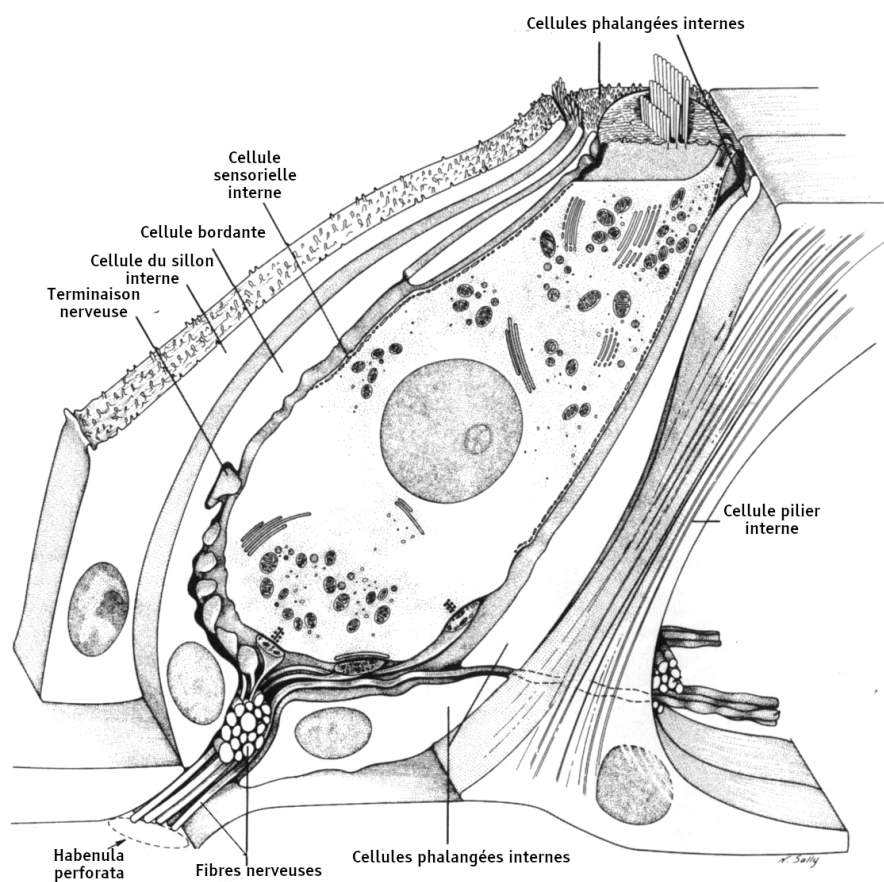


FIGURE 9 – Représentation de la cellule sensorielle interne et de ses cellules voisines. Repris et modifié depuis Lim (1986).

neurotransmetteur, probablement du glutamate (Raphael et Altschuler, 2003; Safieddine *et al.*, 2012).

### **Les cellules sensorielles externes**

Les cellules sensorielles externes sont réparties sur 3 rangées<sup>12</sup> et sont donc plus nombreuses que les cellules sensorielles internes (environ 12000 chez l'Homme) (Figure 11). Elles sont de forme cylindrique, présentent un noyau arrondi en position basale, un grand nombre de mitochondries alignées le long de leur membrane latérale et possèdent 3 ou 4 rangées de stéréocils disposés en W dont les pointes sont orientées vers le mur latéral (Chèvremont, 1980; Coujard et Poirier, 1980; Raphael et Altschuler, 2003) (Figure 10). Leur

<sup>12</sup>Excepté chez les animaux à l'audition spécialisée dans les basses fréquences : les cellules sensorielles externes sont absentes au niveau apical du canal cochléaire (Raphael *et al.*, 1991).

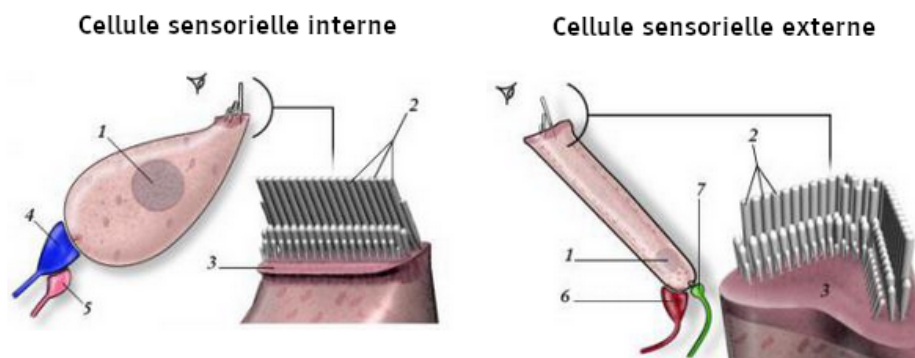


FIGURE 10 – Représentation des cellules sensorielles et de la disposition de leurs stéréocils. 1 : noyau, 2 : stéréocils, 3 : plaque cuticulaire, 4 : fibre nerveuse (neurone de type I), 5 : efférence latérale, 6 : efférence médiane, 7 : fibre nerveuse (neurone de type II). Repris depuis le site web Voyage au centre de l'audition (2016).

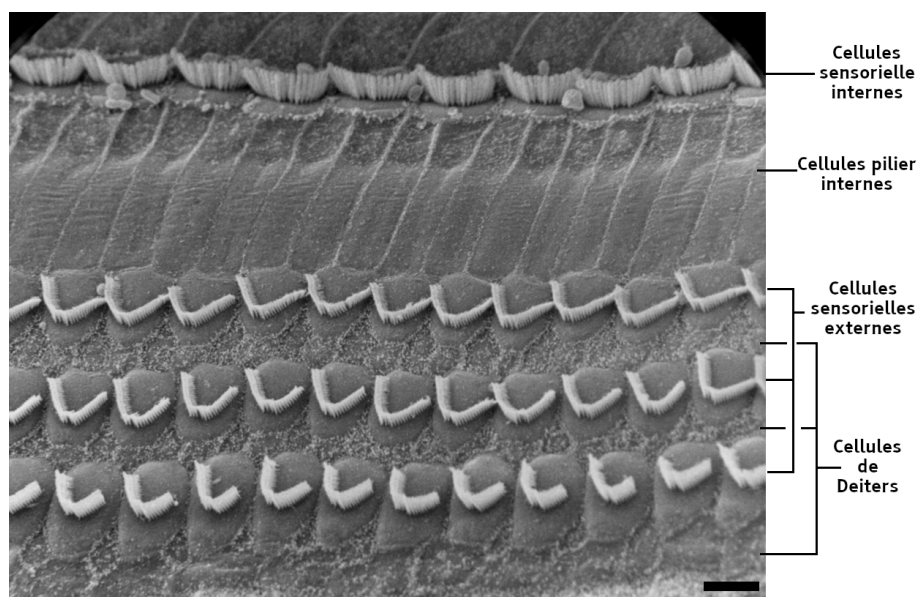


FIGURE 11 – Photographie en microscopie électronique à balayage de la surface de l'organe de Corti. Repris depuis le site web du laboratoire du Dr Robert Harrison (2021). Barre : 2  $\mu\text{m}$ .

taille varie selon un gradient croissant de la base vers l'apex du canal cochléaire. Comme dans les cellules sensorielles internes, les filaments intermédiaires telles les cytokératines semblent absents des cellules sensorielles externes (Anniko *et al.*, 1987). Sous leur membrane latérale, un cytosquelette composé par un réseau de filaments d'actine et de spectrine est intercalé entre une ou plusieurs rangées de saccules ou citernes qui partagent des caractéristiques

communes au réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi (Holley et Ashmore, 1990; Holley *et al.*, 1992; Pollice et Brownell, 1993) (Figure 12). Dans l'espace sous-cuticulaire, des saccules membranaires, disposés de manière concentrique et entourés par des mitochondries, sont observés : ce sont les corps de Hensen (Lim, 1986). Le pôle basal des cellules sensorielles, qui repose dans la cupule formée par la cellule de Deiters sous-jacente, est connectée par de larges terminaisons provenant du système efférent médian. Entre ces synapses efférentes se glissent un ou deux petits boutons dendritiques d'une fibre afférente.

La propriété physiologique majeure des cellules sensorielles externes est l'électromotilité. Cette propriété contractile originale est un mécanisme rapide résultant de la dépolarisation de la cellule sensorielle. Cette dépolarisation entraîne la modification de la conformation d'une protéine transmembranaire, la prestine, qui joue ainsi le rôle de protéine motrice (Brownell *et al.*, 1985; Davis, 1983; Pujol, 1990; Zheng *et al.*, 2000).

#### 2.2.2.5 Cellules et structures adjacentes à l'organe de Corti

De part et d'autre de l'organe de Corti se trouvent le sillon interne et le sillon externe (Figure 6). Le sillon interne est recouvert par un épithélium cubique ou aplati. Une seule rangée de hautes cellules bordantes sépare l'organe de l'audition du sillon interne. Ces cellules présentent de nombreuses microvillosités au niveau de leur pôle apical (Chèvremont, 1980).

Le limbe spiral, situé dans la partie médullaire du sillon interne, est revêtu par un épithélium de cellules cylindriques, les cellules interdentaires. Celles-ci ne forment de revêtement continu que dans leur zone apicale; leur pôle basal s'insère dans le chorion sous-jacent formant des saillies nommées *dents de Huschke* (Coujard et Poirier, 1980). Ces cellules possèdent une membrane apicale épaissie en contact avec la membrane tectoriale, un noyau en position centrale et un cytoplasme contenant une zone golgienne importante; de nombreuses vésicules se constituent dans cette zone et semblent transférer le matériel sécrétoire par la membrane apicale dans la membrane tectoriale (Chèvremont, 1980).

La membrane tectoriale est une structure fibreuse, gélifforme et acellulaire, composée par différents types de collagènes ainsi que par des polypeptides glycosylés (Richardson *et al.*, 1987; Slepecky *et al.*, 1992). Sa largeur ainsi que son épaisseur augmentent en suivant le

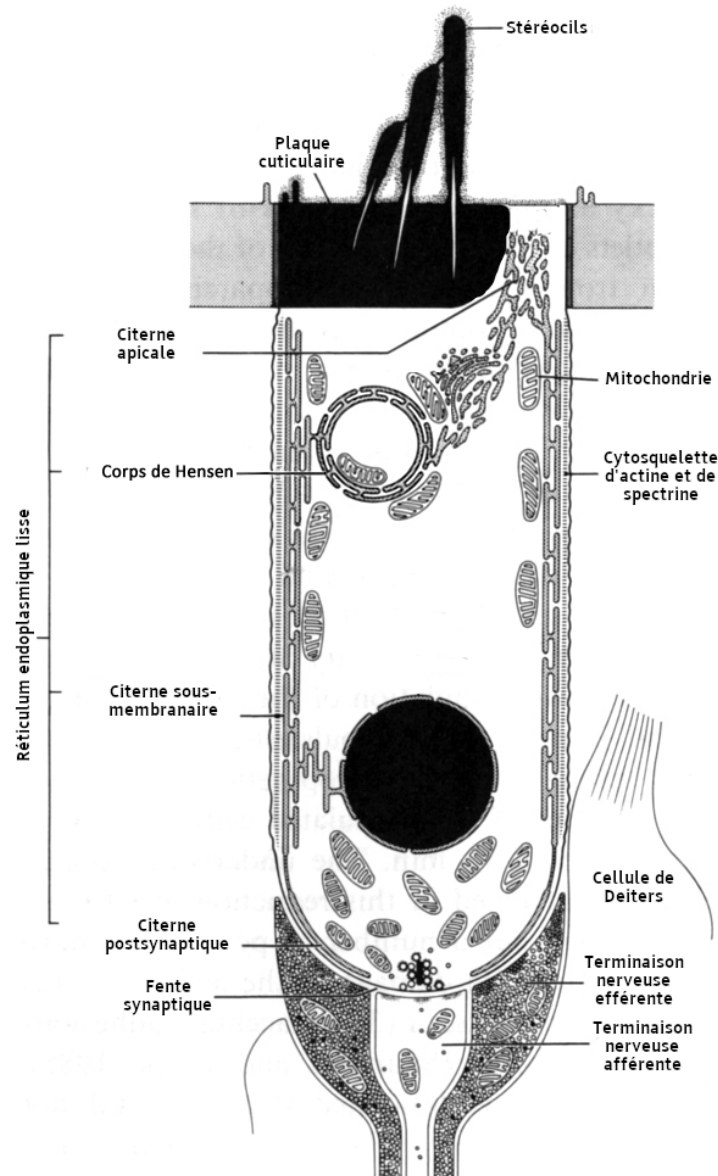


FIGURE 12 – Représentation de la cellule sensorielle externe.  
Repris et modifié depuis Lim (1986).

gradient base-apex du canal cochléaire (Dulguerov et Remacle, 2005). Cette structure est histologiquement divisée en trois couches et seule sa partie externe, nommée membrane de Kimura, est en contact avec le pôle apical des cellules de l'organe de Corti. Il semble néanmoins que seuls les stéréocils les plus longs des cellules sensorielles externes lui soient liés. Notons également que la membrane tectoriale est perforée de fins canalicules qui serviraient à la circulation de l'endolymphe (Lim, 1972; Steel, 1983).

Le sillon externe est composé de plusieurs types cellulaires distincts. Les premières cellules bordant l'organe de Corti du côté externe sont les cellules tectales supportées par les cellules sous-tectales qui sont en contact avec la membrane basale (Malgrange *et al.*, 2002; Rueda *et al.*, 1993). À l'extérieur des cellules tectales et sous-tectales se trouvent les cellules de Hensen. Disposées sur quelques rangées, elles sont hautes et volumineuses et possèdent un noyau rond en position moyenne. Leur surface ne présente que quelques petites microvillosités. Dans la partie basale du canal cochléaire, des cellules de forme cubique, les cellules de Böttcher, sont recouvertes et séparées de la lumière du canal cochléaire par les cellules de Hensen ainsi que par les cellules de Claudius<sup>13</sup>. Ces dernières sont également de forme cubique et au cytoplasme moins riche en organites que les cellules de Böttcher (Cloes *et al.*, 2013; Roth et Bruns, 1992b).

#### 2.2.2.6 Le ganglion spiralé et l'innervation de l'organe de Corti

Le ganglion spiralé est le premier relais de l'information auditive en provenance des cellules sensorielles. Localisé au sein du canal de Rosenthal, un espace en forme de spirale dans la columelle, il est composé par deux types de neurones. Les neurones de type I sont des cellules bipolaires à soma volumineux, au cytoplasme riche en organites, et représentent 90 à 95% de l'ensemble des neurones du ganglion spiralé. Ces neurones sont myélinisés et, fait inhabituel, cette myélinisation s'étend au corps cellulaire ainsi qu'à la racine de la dendrite. Plus petits que les neurones de type I, les neurones de type II sont bipolaires ou pseudo-unipolaires et ne sont pas myélinisés (Coate et Kelley, 2013; Kiang *et al.*, 1982; Moralee, 1996; Spoendlin, 1969). Des cellules gliales telles que les cellules de Schwann et les cellules satellites sont étroitement associées aux neurones du ganglion spiralé (Lang *et al.*, 2011).

Deux catégories de fibres nerveuses se terminent au niveau de l'organe de Corti : des fibres afférentes sensorielles et des fibres efférentes effectrices. Les premières, au nombre d'approximativement 50000 chez l'Homme, correspondent aux terminaisons dendritiques des neurones du ganglion spiralé (Coujard et Poirier, 1980). Chaque neurone de type I, dont la gaine de myéline disparaît juste avant le passage des fibres par l'*habeluna perforata*, est connecté de façon spécifique à une cellule sensorielle interne unique. Chaque cellule sensorielle

---

<sup>13</sup>Les cellules de Böttcher sont absentes de la partie apicale du canal cochléaire (Roth et Bruns, 1992b)

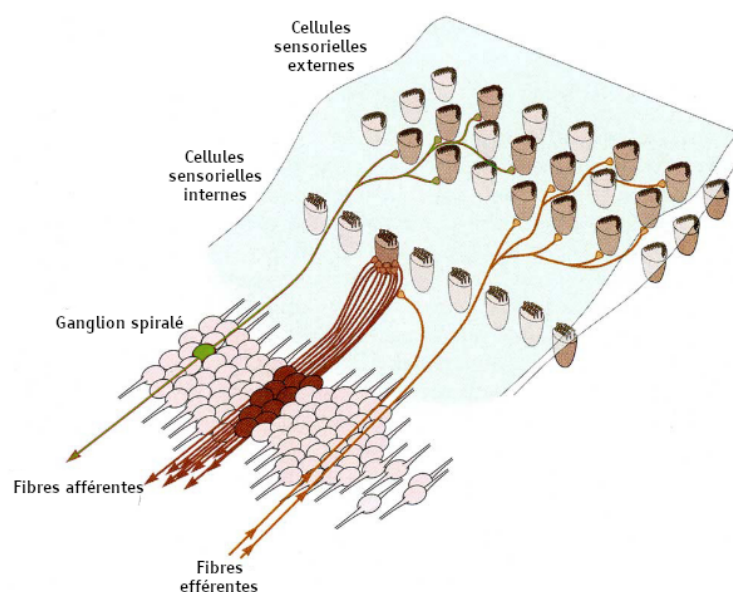


FIGURE 13 – Représentation schématique de l'innervation de l'organe de Corti. En vert, l'innervation afférente des cellules sensorielles externes par les neurones de type II. En rouge, l'innervation afférente des cellules sensorielles internes par les neurones de type I. En orange, les innervations efférentes. Repris et modifié depuis Graven et Browne (2008).

interne est connectée à environ une dizaine de neurones. Les neurones de type II du ganglion spiralé, se ramifient pour innover plusieurs cellules sensorielles externes après avoir effectué un important trajet spiral dans le tunnel de Corti ou entre les cellules de Deiters (Berglund et Ryugo, 1987). L'innervation varie quelque peu en fonction de l'espèce de mammifère étudiée ainsi que le long de l'axe base-apex du canal cochléaire (Rubel et Fritsch, 2002; Ryugo *et al.*, 1991). Les fibres efférentes, au nombre d'approximativement 500 chez l'Homme, se ramifient abondamment pour prendre contact avec de nombreuses cellules sensorielles tant internes que externes (Coujard et Poirier, 1980) (Figure 13).

Deux types de fibres efférentes sont également distinguées. D'une part, les fibres du système efférent latéral issues de petits neurones de l'olive supérieure latérale qui contactent les fibres afférentes des neurones de type I juste sous les cellules sensorielles internes ; et d'autre part, les fibres du système efférent médian issues de neurones situés bilatéralement dans le complexe olivaire supérieur médian qui innervent les cellules sensorielles externes (Malmierca et Ryugo, 2011; White et Warr, 1983).



## 3 | L'audition chez les mammifères

### 3.1 Notions préliminaires

#### 3.1.1 Le son

Le son est une onde sinusoïdale, le plus souvent longitudinale, créée à l'origine par une perturbation mécanique. La propagation de l'onde sonore est caractérisée par une vibration des molécules du milieu<sup>14</sup> autour de leurs positions d'équilibre : suite à la perturbation, les molécules du milieu s'entrechoquent entre elles, subissant des micro-déplacements, et transmettent la perturbation. L'onde sonore peut ainsi être représentée par une succession de compressions et de dilatations des molécules du milieu ; il s'agit d'une propagation d'énergie dans un milieu matériel sans transport de matière (Giancoli, 1993; Hudspeth, 2005; Lorenzi et Chaix, 2011; Schoffeniels et Moonen, 1993).

Les sons peuvent être caractérisés par leur fréquence, leur intensité et leur pression sonore :

- La *fréquence*  $f$  d'une onde sonore détermine sa hauteur. Plus la fréquence est élevée, plus le son est haut ou aigu. Mesurée en Hertz (Hz), la fréquence d'un son correspond au nombre de vibrations par seconde d'un point du milieu dans lequel le son se propage (Giancoli, 1993). L'oreille humaine est sensible à une plage de fréquences allant approximativement de 20 Hz à 20 kHz. Les sons dont les fréquences se situent sous 20 Hz sont appelés infrasons et ceux qui se situent au-dessus de 20 kHz se nomment des ultrasons (Lewis, 2004; Schoffeniels et Moonen, 1993). Il est à noter que certaines espèces de dauphins et de chauve-souris sont capables de détecter de très hautes

---

<sup>14</sup>Ce milieu peut être solide, liquide ou gazeux.

fréquences, jusqu'à 150 kHz alors que très peu de systèmes auditifs non mammaliens sont capables de détecter des sons possédant des fréquences supérieures à 10 kHz.

- L'intensité  $IL$  (Intensity Level) du son représente la quantité d'énergie passant à travers une unité de surface par unité de temps. Les unités de l'intensité sont les  $W/m^2$ . Mais l'oreille humaine étant sensible à des intensités sonores allant de  $10^{-12}W/m^2$  à plus de  $1 W/m^2$ , les niveaux d'intensité sont exprimés en *décibels* (dB) plus aisée à appréhender par la relation suivante :

$$IL = 10\log_{10}(I/I_0) \text{ dB}$$

Soit le logarithme décimal du rapport de l'intensité du son,  $I$  (en  $W/m^2$ ), à celle d'un son de référence,  $I_0$ , habituellement  $1 \times 10^{-12} W/m^2$  (Giancoli, 1993; Petit, 2009b). Cette valeur de référence a été choisie parce qu'elle correspond à la valeur seuil de perception auditive humaine aux fréquences de 1 à 3 kHz auxquelles l'acuité auditive humaine est la plus élevée (Schoffeniels et Moonen, 1993).

- La *pression sonore*  $P$ , mesurée par des microphones, est représentée par sa valeur physique en  $N/m^2$  ou Pa comme toute autre pression. En acoustique cependant, une valeur relative est utilisée, le *niveau de pression SPL* (Sound Pressure Level) exprimé en dB.

En raison de la relation suivante :

$$I = \frac{P^2}{\rho * C}$$

Avec  $I$  l'intensité du son ( $W/m^2$ ),  $P$  la pression acoustique (en  $N/m^2$ ),  $\rho$  la masse volumique du milieu (en  $kg/m^3$ ) et  $C$  la célérité de propagation de l'onde (en m/s).

Le niveau de pression sonore est donnée par l'équation suivante :

$$SPL = 10\log_{10}\left(\frac{P}{P_0}\right)^2 = 20\log_{10}\left(\frac{P}{P_0}\right) \text{ dB}$$

Soit le logarithme décimal du rapport de la pression du son incident,  $P$  (en  $N/m^2$ ), à celle du son de référence,  $P_0$ , habituellement  $2 * 10^{-5}N/m^2$  (Petit, 2009b; Schoffeniels

et Moonen, 1993).

Un décibel correspond approximativement au plus petit changement d'intensité sonore qu'un humain peut percevoir. Pour un son donné, les valeurs en dB IL et en dB SPL sont identiques, mais en acoustique et dans la pratique courante, l'intensité des sons est exprimée en dB SPL (Dulguerov et Remacle, 2005; Petit, 2009b).

Alors que la fréquence qui dépend de la source émettrice, reste inchangée, l'intensité ainsi que la vitesse de propagation du son peuvent être modifiées par la nature du milieu. De plus, chaque milieu possède une résistance au passage du son appelée impédance caractéristique  $Z^c$ . Il est possible d'estimer la valeur de l'impédance caractéristique d'un milieu par la relation suivante :

$$Z^c = \rho * C$$

Où  $Z^c$  est l'impédance caractéristique (en kg/m.s),  $\rho$  la masse volumique du milieu (en kg/m<sup>3</sup>) et C la célérité de propagation de l'onde (en m/s) (Lorenzi et Chaix, 2011). Cette relation montre que plus l'impédance caractéristique d'un milieu est élevée, plus la vitesse de propagation du son est grande. De plus, l'équation

$$I = \frac{p^2}{\rho * C}$$

peut se simplifier :

$$I = \frac{p^2}{Z^c}$$

Démontrant ainsi que plus l'impédance caractéristique du milieu traversé est forte, plus l'intensité sonore diminue (Petit, 2009b).

### 3.1.2 Une définition de l'audition

La nature du stimulus sonore ne suffit pas à définir l'audition. De plus, donner une définition à l'audition dans le monde animal n'est pas une chose aisée. La frontière entre détection sismique et détection des sons est parfois assez floue (Lewis, 2004; Ossiannilsson, 1949, dans Hill, 2009). En effet, la détection et la distinction des vibrations du milieu par des organes

sensoriels superficiels doivent-elles être considérées comme de l'audition ?

Un consensus existe néanmoins et l'audition peut être définie comme étant la possibilité de décomposer un signal périodique complexe d'ondes de pression d'une intensité de moins de 100 dB SPL en ses fréquences élémentaires par un organe sensoriel de l'audition et pouvant entraîner ainsi une réponse physiologique et/ou comportementale (Lewis, 2004; Petit, 2009a). Par cette définition, l'audition est présente chez tous les vertébrés (à l'exception des agnathes) et chez certaines sous-classes de l'embranchement des euarthropodes (Fay, 1988).

### 3.2 Fonctionnement de l'audition chez les mammifères

Les structures de l'oreille externe permettent le cheminement de l'onde sonore vers le tympan ainsi qu'une certaine amplification des sons en fonction de leur fréquence<sup>15</sup> (Fischer et Schäfer, 1991). Le tympan reçoit les vibrations acoustiques et les transmet à la chaîne des osselets de l'oreille moyenne. Cette dernière joue un rôle important dans la transmission de l'information sonore : l'effet de levier assuré par les trois osselets ainsi que la pression sonore reportée de la surface relativement étendue du tympan sur la surface beaucoup plus petite de la fenêtre ovale permettent à l'oreille moyenne d'adapter la faible impédance du milieu aérien ambiant à l'impédance plus élevée du milieu liquide de l'oreille interne. L'amplification réalisée par ces mécanismes varie en fonction de la fréquence de l'onde sonore incidente et peut atteindre, chez l'Homme, 27 dB SPL à la fréquence de 1 kHz (Rondal et Seron, 2000).

Les vibrations de la platine de l'étrier dans la fenêtre ovale génèrent au niveau de la périlymphe une onde de pression capable de se propager dans les fluides de l'oreille interne, entraînant également un mouvement compensatoire quasiment instantané de la fenêtre ronde. Les déplacements liquidiens induits par cette onde de pression fournissent l'énergie nécessaire aux déplacements vibratoires de la membrane basilaire (Von Békésy, 1960; Dulguerov et Remacle, 2005; Olson, 1999).

A chaque mouvement de la membrane basilaire, les stéréocils des cellules sensorielles externes implantés dans la membrane tectoriale sont déplacés horizontalement, entraînant ainsi l'ouverture des canaux de transduction et l'entrée des ions  $K^+$  et  $Ca^{2+}$  à l'intérieur des

---

<sup>15</sup>Chez l'Homme, jusqu'à 15 dB SPL autour de 3000 Hz (Dulguerov et Remacle, 2005).

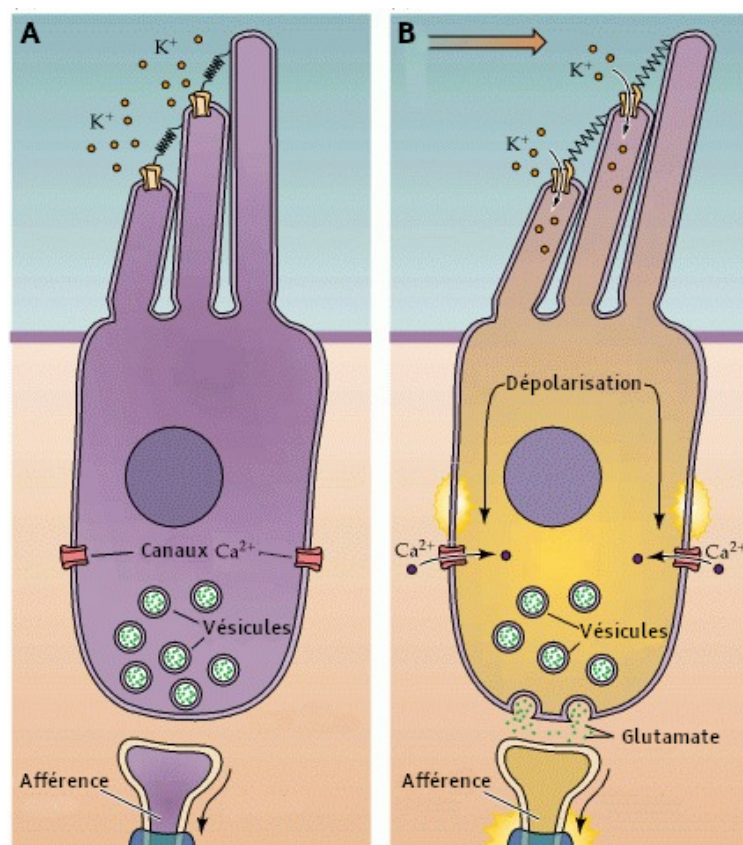


FIGURE 14 – Représentation schématique de la dépolarisation d'une cellule sensorielle. A vers B : la déflexion de la touffe stéréociliaire dans la direction des stéréocils les plus longs permet l'ouverture des canaux de transduction mécano-électriques. Cette dernière entraîne alors l'entrée d'ions  $K^+$  qui dépolarisent la cellule provoquant l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants présents à la surface baso-latérale des cellules sensorielles. L'afflux de calcium déclenche alors la libération du neurotransmetteur par exocytose dans la fente synaptique. Repris et modifié depuis Purves *et al.* (2001).

cellules<sup>16</sup> (Hackney et Furness, 2013). Grâce à leur propriété électromotile, la dépolarisation des cellules sensorielles externes entraîne leur contraction (Brownell *et al.*, 1985). Ces contractions sont responsables d'une amplification de la vibration permettant alors la mobilisation des stéréocils des cellules sensorielles internes qui entrent en contact avec une zone de la membrane tectoriale nommée *bande de Hensen*. À leur tour dépolarisées, les cellules

<sup>16</sup>Des ions  $Na^+$  et  $Mg^{2+}$  peuvent également passer par les canaux de transduction mécano-électriques malgré leur faible concentration dans l'endolymphe (Hackney et Furness, 2013).

sensorielles internes libèrent du glutamate dans les fentes synaptiques, permettant ainsi la création d'un potentiel d'action dans les neurones de type I du ganglion spiral qui leur sont connectés (Dulguerov et Remacle, 2005; Purves et Coquery, 2005; Raphael et Altschuler, 2003) (Figure 14) .

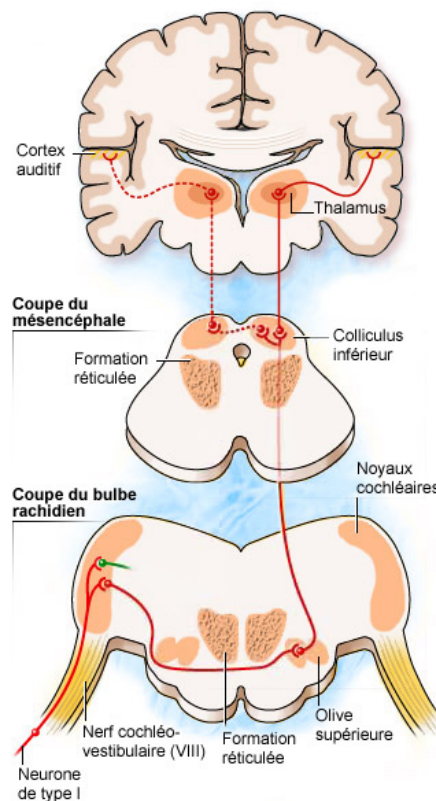


FIGURE 15 – Représentation schématique de la voie auditive primaire. Repris depuis le site web Voyage au centre de l'audition (2016).

À l'instar des autres modalités sensorielles, l'audition possède une voie et des centres primaires totalement dédiés à cette fonction, ainsi que des voies dites non primaires où convergent l'ensemble des modalités sensorielles (Purves *et al.*, 2001). Dans la voie auditive primaire, le nerf auditif, constitué par les axones des neurones de type I, entre dans le tronc cérébral où un premier relais est effectué au niveau des noyaux cochléaires. La voie primaire croise ensuite la ligne médiane pour monter au cerveau : elle relaie dans l'olive supérieure, le colliculus inférieur et enfin le thalamus (dans le corps genouillé médian) avant d'aboutir au cortex auditif primaire situé dans la circonvolution de Heschl (Bear *et al.*, 2007) (Figure 15).

### 3.2.1 La tonotopie cochléaire

Au sein de la cochlée, la localisation de la transduction d'un son est déterminée en fonction de sa fréquence. Cette distribution fréquentielle se nomme la *tonotopie cochléaire*. Cette tonotopie cochléaire est rendue possible grâce à deux mécanismes : un mécanisme passif et un mécanisme actif.

#### *Mécanisme passif*

Comme décrit dans le chapitre consacré à la description morphologique du canal cochléaire (voir 2.2.2.1), il existe, le long de l'axe base-apex, une variation continue des dimensions des différentes structures. La membrane basilaire notamment, est épaisse et étroite à la base ; vers l'apex, elle devient plus fine et plus large. Elle possède ainsi des propriétés mécaniques différentes : sa rigidité décroît de la base à l'apex de la cochlée. Cette différence structurelle permettrait à la membrane basilaire de jouer le rôle d'analyseur fréquentiel. En effet, l'onde de pression générée par un son se propage le long de la membrane basilaire selon l'axe base-apex. Pour les sons de hautes fréquences, la vibration de la membrane basilaire est maximale au niveau basal de la cochlée tandis que pour les sons de basses fréquences, cette vibration est maximale au niveau apical de la cochlée (Von Békésy, 1960) (Figure 16).

D'autres gradients anatomiques tels que la taille des cellules sensorielles externes ou encore la taille des stéréocils contribuent certainement à la sélectivité fréquentielle de l'organe de Corti (Dulguerov et Remacle, 2005).

#### *Mécanisme actif*

La tonotopie passive est néanmoins insuffisante pour expliquer l'excellente discrimination des fréquences par la cochlée. Les contractions des cellules sensorielles externes électromotiles permettent d'amplifier d'environ 50 dB les vibrations d'une portion très étroite de la membrane basilaire (Figure 17). Grâce au couplage entre les cellules sensorielles externes et les structures adjacentes, cette amplification sera répercutée sur les cellules sensorielles internes, aux fréquences correspondantes, par l'intermédiaire de la membrane tectoriale (Figure 18). Ainsi,

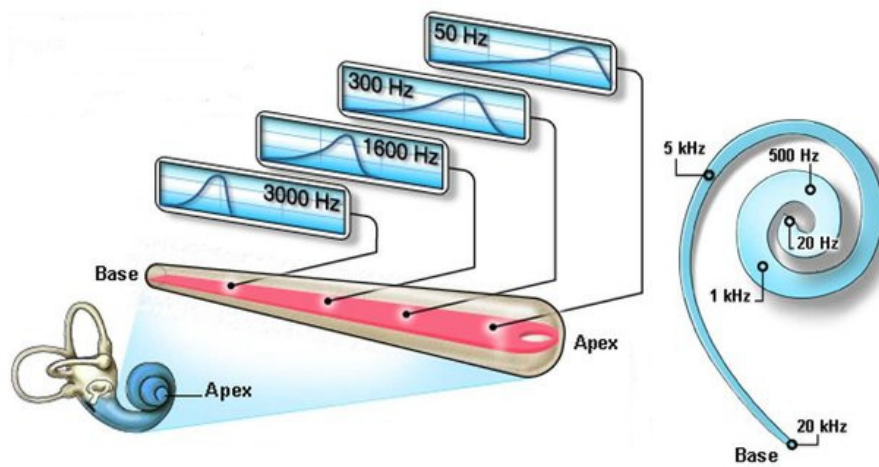


FIGURE 16 – Représentation schématique de la tonotopie cochléaire induite par la membrane basilaire. La position du maximum d'amplitude de l'onde propagée dépend de la fréquence du son : pour les aigus il sera près de la base de la cochlée et pour des sons graves vers son apex. À droite, la répartition des fréquences sur une membrane basilaire humaine. Repris et modifié depuis le site web Voyage au centre de l'audition (2016).

deux fréquences très proches peuvent donc activer deux zones distinctes de la cochlée permettant ainsi de les distinguer l'une de l'autre (Pujol, 1990). Une modulation de cette amplification induite par la capacité d'électromotilité des cellules sensorielles externes est réalisée par le système efférent médian. Celui-ci, par l'intermédiaire de récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine situés à la base des cellules sensorielles externes, est capable de provoquer l'hyperpolarisation de ces dernières. Cette hyperpolarisation induit alors une réduction de l'électromotilité des cellules sensorielles externes (Elgoyhen et Franchini, 2011; He et Dallos, 1999; Lamas *et al.*, 2015).

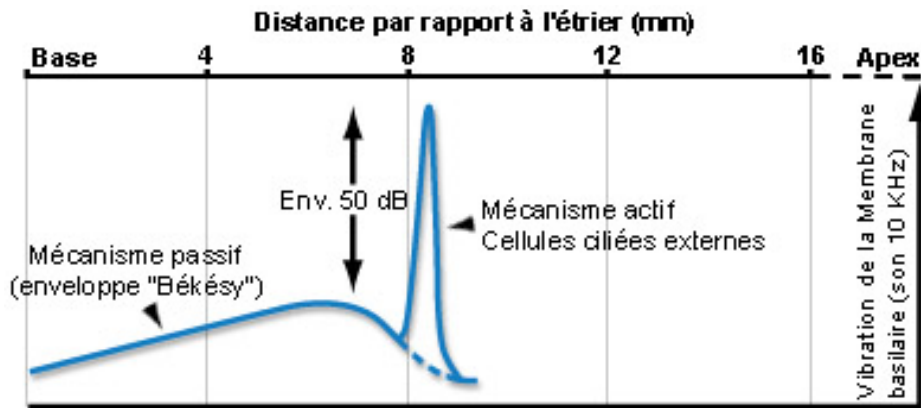


FIGURE 17 – Illustration du mécanisme actif de l'audition. Les contractions des cellules sensorielles externes permettent une amplification d'environ 50dB des vibrations d'une portion très étroite de la membrane basilaire. Repris depuis le site web Voyage au centre de l'audition (2016).

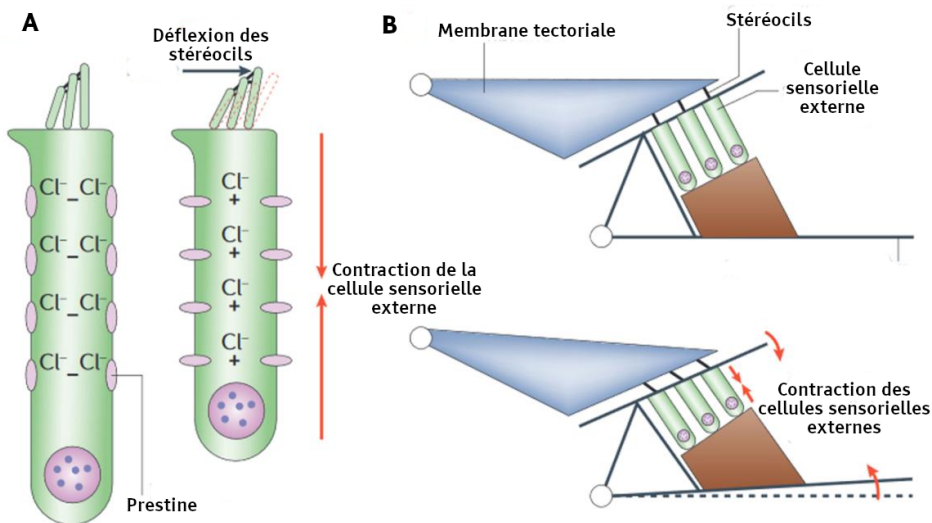


FIGURE 18 – Représentation graphique de la motilité des cellules sensorielles externes. A : la déflexion des stéréocils des cellules sensorielles externes provoque la dépolarisation de celles-ci ayant pour effet de déplacer les ions Cl<sup>-</sup> liés à la prestine vers le cytoplasme de la cellule. Ce déplacement entraîne alors un changement de conformation de la prestine qui aura comme effet une contraction de la cellule. B : la contraction coordonnée des cellules sensorielles externes entraîne une modification temporaire dans la morphologie de l'organe de Corti. Repris et modifié depuis Fettiplace et Hackney (2006).



## 4 | Développement de l'organe de l'audition

La formation de l'organe de l'audition est certainement l'un des plus remarquables événements de l'organogenèse des vertébrés (Barald et Kelley, 2004). Néanmoins, après plus d'un siècle d'étude et malgré les avancées de cette dernière décennie, force est de constater que notre connaissance des mécanismes morphologiques et cellulaires qui sous-tendent son développement reste encore limitée.

### 4.1 L'oreille interne

Le premier signe visible du développement de l'oreille interne est l'apparition de la placode otique aux alentours de la moitié du huitième jour embryonnaire (E8.5) chez la souris (Rubel, 1978; Sher, 1971). Cet épaissement de l'ectoderme, situé près des rhombomères 5 et 6, se forme sous l'influence de signaux inducteurs provenant du rhombencéphale, de l'ectoderme et du mésoderme crânien (Fritzschn, 1996; Noramly et Grainger, 2002; Solomon et Fritz, 2002). La placode otique va s'invaginer pour former la cupule otique (Figure 19).

Aux environs de E9.5 chez la souris, la cupule otique va s'isoler de la surface pour devenir un simple sac épithélial nommé vésicule otique ou otocyste (Barald et Kelley, 2004; Represa *et al.*, 1990). Suite à la formation de la vésicule otique, des neuroblastes émigrent de sa région antéro-ventrale et se différencient en cellules ganglionnaires. Elles forment alors le ganglion stato-acoustique, également appelé ganglion cochléo-vestibulaire (GCV) (Barald et Kelley, 2004; D'Amico-Martel et Noden, 1983; Torres et Giráldez, 1998; Van Laer *et al.*, 2001).

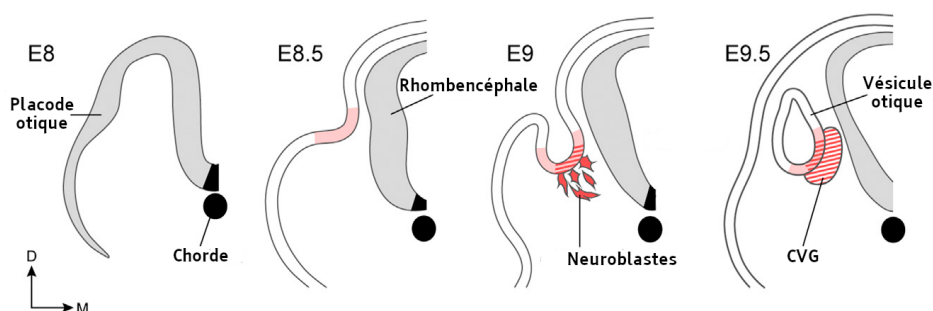


FIGURE 19 – Représentation schématique du développement de l'oreille interne depuis l'invagination de la placode otique jusqu'à la formation de la vésicule otique. CVG : ganglion cochléo-vestibulaire, D : dorsal, M : médial. Repris et modifié depuis Wu et Sandell (2016).

Ultérieurement, celui-ci sera scindé en deux structures distinctes : le ganglion vestibulaire ou ganglion de Scarpa et le ganglion cochléaire ou ganglion spiralé. Excepté deux types cellulaires, tous les composants cellulaires épithéliaux et ganglionnaires de l'oreille interne proviennent de la placode otique et possèdent donc une origine ectodermique (Pirvola *et al.*, 2004). Les mélanoblastes, futurs mélanocytes de la strie vasculaire et des régions des cellules sombres vestibulaires, ainsi que les cellules gliales des ganglions cochléaire et vestibulaire proviendraient en effet de cellules dérivant des crêtes neurales (Breuskin *et al.*, 2010; Douarin, 1980; Mao *et al.*, 2014; Torres et Giráldez, 1998).

Durant le développement, la morphologie de la vésicule otique va changer. Depuis l'apparence d'un simple sac épithélial, celle-ci va évoluer en une structure élaborée remplie de liquide, le labyrinthe membraneux (Barald et Kelley, 2004). Dans le même temps, l'oreille interne en développement va également recruter le mésenchyme environnant afin que celui-ci forme le labyrinthe osseux qui engaine le labyrinthe membraneux (Pirvola *et al.*, 2004).

## 4.2 La cochlée et le canal cochléaire

Aux alentours de E11 chez la souris, le canal cochléaire peut déjà être identifié comme une évagination de la région ventro-médiane de la vésicule otique<sup>17</sup> (Hensen, 1863; Kelley et Bianchi, 2001; Morsli *et al.*, 1998). À partir de E12.5, le canal cochléaire en formation

<sup>17</sup>L'appareil vestibulaire émane quant à lui de la partie dorsale de la vésicule otique (Swanson *et al.*, 1990).

entame la spirale qui formera la cochlée. À cette période, des différences dans la composition épithéliale des faces dorsale et ventrale du canal cochléaire sont déjà visibles (Anniko, 1983; Lim et Anniko, 1985) : la face ventrale destinée à devenir la membrane de Reissner, présente 2 à 3 couches de noyaux cellulaires tandis que la face dorsale quant à elle, en compte 5 à 6 (Anniko, 1983; Kikuchi et Hilding, 1965; Lim et Anniko, 1985; Retzius, 1884; Sher, 1971). Au sein de cette face dorsale, des protéines telles que Sox2 (*Sex determining region Y box 2*), Jag1 (*Jagged Canonical Notch Ligand 1*), Bmp4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*) et Wnt (*Proto-oncogene Wnt (Wingless & Integration Site)*) sont alors exprimées de manière localisée et vont jouer un rôle prépondérant dans l'établissement d'un domaine prosensoriel, zone de l'épithélium destinée à devenir l'organe de Corti (Iizuka-Kogo, 2018).

### La voie de signalisation Wnt

La voie de signalisation Wnt est une des voies majeures de signalisation dans le développement embryonnaire et l'homéostasie des tissus adultes. Les Wnt sont une famille de 19 glycoprotéines sécrétées qui signalent principalement par l'intermédiaire des récepteurs à sept domaines transmembranaires de la famille Frizzled (Fzd) (Clevers, 2006). Cette association est au carrefour de trois catégories de la voie de signalisation : la voie Wnt canonique ou Wnt/caténine- $\beta$ , la voie PCP (*Planar Cell Polarity*) et la voie calcique<sup>18</sup>.

Dans la voie de signalisation Wnt canonique, lorsque celle-ci est inactive, la caténine- $\beta$  synthétisée dans le cytoplasme est dégradée par l'action d'un complexe composé des protéines d'échafaudage axine, APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), ainsi que par des kinases Ck1 (*Casein Kinase 1*) et Gsk3 $\beta$  (*Glycogen Synthase Kinase 3  $\beta$* ). Ce complexe se lie à la caténine- $\beta$ , que Ck1 et Gsk3 $\beta$  phosphorylent. La caténine- $\beta$  phosphorylée est alors reconnue par l'ubiquitine ligase  $\beta$ -TrCP ( *$\beta$ -Transducin Repeat Containing Protein*) et dégradée par le protéasome. En l'absence de caténine- $\beta$ , les gènes cibles de la voie Wnt sont réprimés par les facteurs de transcription de la famille Tcf/Lef (*T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor*) liés à Groucho/Tle (*Groucho/Transducin-Like Enhancer of Split*) (Patel et al., 2019; Plouhinec et Taelman, 2011).

L'interaction du ligand Wnt avec les récepteurs Lrp5/6 (*Low Density Lipoprotein Receptor*

---

<sup>18</sup>Il existe également une voie canonique divergente, indépendante de la caténine- $\beta$ , agissant principalement sur la stabilité des microtubules (Krylova et al., 2000)

*Related Protein 5/6*) et Frizzled entraîne le recrutement par ces récepteurs des protéines axine et Gsk3 $\beta$  et l'inhibition de l'activité du complexe de destruction. La caténine- $\beta$ , qui n'est plus phosphorylée ni dégradée, s'accumule alors dans le cytoplasme de la cellule et transloque dans le noyau. Elle forme alors un complexe avec les facteurs de transcription Tcf/Lef et active les gènes cibles de la voie Wnt (20) (Patel *et al.*, 2019; Plouhinec et Taelman, 2011).

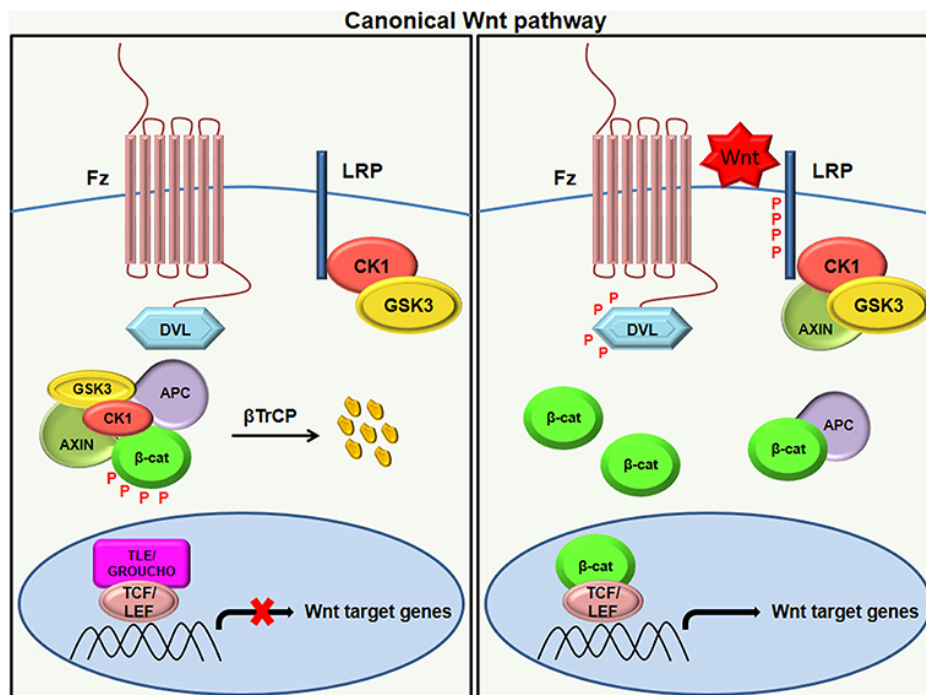


FIGURE 20 – Représentation graphique de la voie de signalisation Wnt canonique. À gauche, lorsque la voie est inactive, la caténine- $\beta$  est amenée à être dégradée par le protéasome. À droite, dans la voie Wnt activée, la caténine- $\beta$  transloque dans le noyau et forme un complexe avec TCF/LEF, activant les gènes cibles de la voie de signalisation. Repris depuis Patel *et al.* (2019).

Au sein de la voie de signalisation Wnt non-canonique ou voie PCP, Wnt se fixe sur Fzd, activant Dvl qui va former des complexes avec RhoA (*Ras homolog family member A*) ou Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) et la kinase JNK (*Jun N-terminal Kinase*) pour stabiliser le cytosquelette d'actine ainsi que le réseau de microtubules (Komiya et Habas, 2008).

### 4.2.1 Le domaine prosensoriel

À partir de E12.5, l'épithélium pseudostratifié situé en position ventrale du canal cochléaire prend le nom d'organe de Kölliker<sup>19</sup> (Kelley, 2007). C'est également à partir de ce stade que le facteur de transcription Sox2 y restreint son expression<sup>20</sup> (Kiernan *et al.*, 2005b; Neves *et al.*, 2013). C'est au sein de la zone d'expression de ce facteur de transcription que se développera l'organe de l'audition.

L'expression de Sox2 dans l'organe de Kölliker pourrait être influencée par le mécanisme d'*induction latérale* initiée par la voie Notch. En effet, Jag1, un ligand du récepteur transmembranaire Notch, est exprimé dans la partie médullaire du canal cochléaire en formation et semble requis pour le maintien de l'expression de Sox2 (Kiernan *et al.*, 2006; Kiernan, 2013).

La limite externe du domaine prosensoriel est défini par l'expression de Bmp4, une importante protéine morphogénétique (Ohyama *et al.*, 2010) (Figure 4.3). La limite interne du domaine prosensoriel serait quant à elle établie par la voie Wnt<sup>21</sup> qui antagoniserait l'activité de Bmp4, ainsi que l'ont suggéré Munnamalai et ses collaborateurs en neutralisant pharmacologiquement l'action de Gsk3 $\beta$  (2016).

#### La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch est une signalisation relativement simple, de type juxtacrine, entre deux cellules adjacentes (Sjöqvist et Andersson, 2017). Elle régule de nombreux processus biologiques, tels que des décisions de destin cellulaire, de prolifération, d'apoptose et de différenciation cellulaire. Chez les mammifères, quatre récepteurs Notch sont identifiés (Notch 1-4) et leurs ligands sont divisés en deux catégories : Delta-like (Dll1, Dll3 et Dll4) et Jagged (Jag1 et Jag2) (Mašek et Andersson, 2017). Plusieurs facteurs influencent la force du signal : le contexte cellulaire, le stade de développement, le type de récepteur et/ou de ligand

---

<sup>19</sup>L'organe de Kölliker n'existe que durant les stades prénataux (Kelley, 2007).

<sup>20</sup>L'ensemble des domaines prosensoriels de l'oreille interne en développement expriment le facteur de transcription Sox2 (Neves *et al.*, 2013).

<sup>21</sup>Au sein de l'organe de Kölliker, plusieurs protéines telles que Wnt5a, Wnt7a et Wnt7b sont exprimées (Qian *et al.*, 2007; Bohnenpoll *et al.*, 2014).

(Gama-Norton *et al.*, 2015). Dans la voie canonique, la liaison du ligand et de son récepteur induira le clivage du domaine intracellulaire de la protéine NICD (*Notch IntraCellular Domain*) sous l'action d'une  $\gamma$ -secretase. NICD transloquera alors dans le noyau pour y activer les gènes cibles de la voie de signalisation en formant un complexe avec CSL (*CBF1/RBPJ/mammal; Suppressor of Hairless/fly; and Lag-1/nematode*) (Kiernan, 2013). Le mécanisme d'induction latérale engendré par Jag1 / Notch est un processus dans lequel la voie de signalisation induit les cellules voisines d'un même pool à adopter un destin cellulaire commun (Sjöqvist et Andersson, 2017). L'inhibition latérale engendrée par la voie de signalisation Notch est le phénomène dans lequel une cellule signale à sa voisine l'adoption d'un destin différent (voir 4.3).

#### 4.2.2 La zone de non-prolifération cellulaire

Une fois le domaine prosensoriel du canal cochléaire déterminé, une étape importante a lieu. Il s'agit de la sortie du cycle cellulaire des cellules qui composent le domaine prosensoriel. Par des injections de thymidine tritiée chez la souris, Ruben (1967) a montré qu'à partir de E13, un groupe de cellules, situées approximativement au centre de l'axe médullo-strial de la face dorsale du canal cochléaire, devient post-mitotique selon un gradient apex-basal. Cette zone de cellules post-mitotiques, qui se caractérisent morphologiquement par leur noyau situé en position basale (Kelley, 2007), atteint la base du canal cochléaire vers E14.5 (Lee *et al.*, 2006b; Ruben, 1967). Cette région de cellules post-mitotiques comprend le domaine prosensoriel (Kelley *et al.*, 1993).

Chen et Segil (1999) ont observé l'expression de p27<sup>kip1</sup> au sein des cellules du domaine prosensoriel. p27<sup>kip1</sup> est un inhibiteur de kinase cycline-dépendante faisant partie de la famille CIP/KIP (*CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein*) et peut entraîner un arrêt de la prolifération en phase G1 du cycle cellulaire en inhibant les complexes cyclines/CDK (*Cyclin-Dependent Kinase*) dont l'activité kinase est requise pour la progression dans le cycle cellulaire (Besson, 2007).

Chez la souris entre E12,5 et E14,5, une bande de cellules situées au sein de l'épithélium dorsal du canal cochléaire devient p27<sup>kip1</sup> positive et ce, parallèlement ou précédant de peu

la sortie de leur cycle cellulaire (Chen et Segil, 1999; Lee *et al.*, 2006b). Cette bande de cellules se trouve à l'endroit du futur organe de Corti et correspond à la région de cellules post-mitotiques observée par Ruben 1967. Cette zone est nommée zone de non-prolifération cellulaire (*Zone of Non-Proliferating Cells, ZNPC*) (Chen et Segil, 1999). Dans la cochlée des souris invalidées pour p27<sup>kip1</sup>, des mitoses sont toujours observées au sein de l'organe de Corti au-delà de la période normale de prolifération cellulaire. Une augmentation du nombre de cellules sensorielles et de cellules de soutien est également observée. p27<sup>kip1</sup> joue donc un rôle essentiel dans la limitation du nombre de progéniteurs post-mitotiques qui se différencieront en cellules sensorielles et en cellules de soutien (Lee *et al.*, 2006b). L'apparition de l'expression de p27<sup>kip1</sup>, précédant les premiers signes de différenciation des cellules sensorielles, ferait de cet inhibiteur de kinase cycline-dépendante l'un des véritables premiers marqueurs spécifiques du domaine prosensoriel<sup>22</sup> (Kelley *et al.*, 2009).

### 4.3 L'organe de Corti

Chez la souris, sur base du nombre de couches de cellules visibles, une distinction peut être faite aux alentours de E15 entre 2 crêtes cellulaires nommées la grande crête épithéliale (*Greater Epithelial Ridge, GER*) et la petite crête épithéliale (*Lesser Epithelial Ridge, LER*) (Koelliker, 1879; Weibel, 1957; Thorn *et al.*, 1978; Kelley et Bianchi, 2001). La grande crête épithéliale représente plus ou moins les deux tiers de la face dorsale du canal cochléaire, tandis que la petite crête épithéliale en représente le tiers restant. Les cellules de la grande crête épithéliale se développeraient en sillon interne et en limbe spiral. Il a été suggéré que les cellules phalangées et les cellules sensorielles internes proviendraient également de la grande crête épithéliale. Les cellules de la petite crête épithéliale se développeraient en cellules sensorielles externes, en cellules de Deiters ainsi qu'en cellules composant le sillon externe. Les cellules piliers se formeraient entre les 2 crêtes (Kelley et Bianchi, 2001; Malgrange *et al.*, 2002; Rueda *et al.*, 1993). D'autres auteurs suggèrent quant à eux que l'ensemble des cellules sensorielles dériveraient soit du GER (Chen et Segil, 1999), soit du LER (Pearson *et al.*, 1973),

---

<sup>22</sup>Plus tard, au cours du développement, l'expression de p27<sup>kip1</sup> dans les cellules sensorielles diminuera. Par contre, elle sera maintenue dans les cellules de soutien (Kelley *et al.*, 2009).

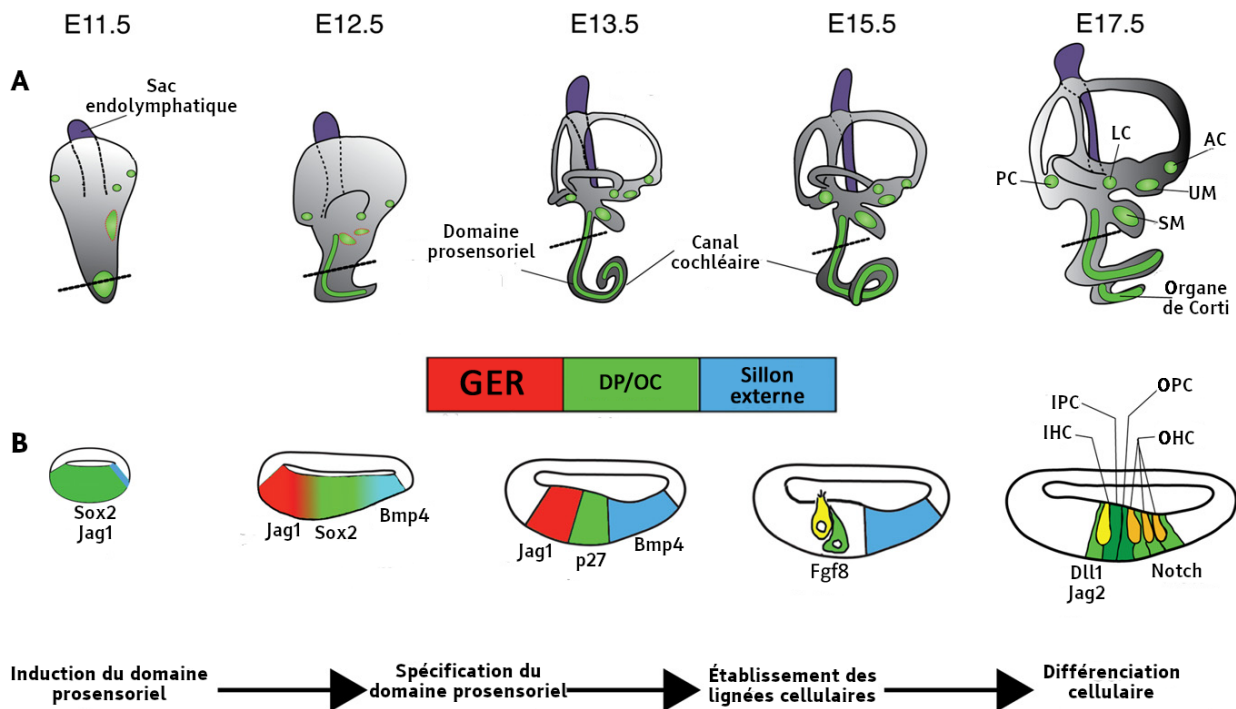


FIGURE 21 – Représentation schématique du développement de l'oreille interne. A : formation du labyrinthe osseux. La ligne dans la cochlée représente le plan de coupe repris en B. B : Développement de l'organe de Corti depuis l'induction du domaine prosensoriel. En rouge : le GER, en vert : DP/OC (Domaine prosensoriel / Organe de Corti), en bleu : le sillon externe, AC : crête ampullaire antérieure, LC : crête ampullaire latérale, PC : crête ampullaire postérieure, UM : macula utriculaire, SM : macula sacculaire, IHC : cellule sensorielle interne, OHC : cellules sensorielles externes, IPC : cellule pilier interne, OPC : cellule pilier externe. Repris et modifié depuis Basch *et al.* (2016a).

sans donner d'autre information à propos des cellules de soutien.

Les mécanismes permettant l'établissement des lignées cellulaires, qui composent l'organe de Corti ainsi que sa mosaïque caractéristique, résultent de l'interaction complexe de plusieurs voies de signalisation telles que Notch, Wnt ou encore FGF (*facteur de croissance des fibroblastes*) (Driver et Kelley, 2009; Eatock, 2006; Fritzsche *et al.*, 2015). Les interactions entre ces différents mécanismes ne sont pas encore parfaitement connus. Néanmoins, il semble que l'activation de la voie Wnt/caténine- $\beta$  au sein du domaine prosensoriel est indispensable à l'expression d'Atoh1 (*Atonal Homolog 1*) (Shi *et al.*, 2014; Jacques *et al.*, 2012). Atoh1 est un facteur de transcription de la famille des bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) qui est considéré comme étant le plus important dans la différenciation des cellules sensorielles (Bermingham *et al.*, 1999). Ses gènes cibles, *Gfi1* (*Growth Factor Independent 1 Transcriptional Repressor*), *Pou4f3* (*POU Class 4 Homeobox 3*) et *Barhl1* (*BarH Like Homeobox 1*) sont tous impliqués dans la différenciation, le

maintien et la survie des cellules sensorielles (Li *et al.*, 2002; Wallis *et al.*, 2003; Walters *et al.*, 2017; Zhong *et al.*, 2019). D'autre part, la voie de signalisation Notch joue un rôle majeur dans l'établissement des lignées cellulaires en agissant sur le niveau d'expression d'Atoh1 dans les futures cellules sensorielles et de soutien. Par un mécanisme d'*inhibition latérale*, Notch permet l'établissement d'une mosaïque cellulaire. Suivant l'influence des ligands Jag2 et Dll1 qui viendront se lier au récepteur extramembranaire de Notch, le domaine intracellulaire de la protéine NICD (*Notch IntraCellular Domain*) sera clivé sous l'action d'une  $\gamma$ -secretase. NICD transloquera alors dans le noyau pour y activer les gènes cibles *Hes* (*Hairy and Enhancer of Split 1*) et *Hey* (*Hairy Ears, Y-Linked*) qui réprimeront l'expression d'Atoh1, guidant la cellule vers la lignée des cellules de soutien (Abdolazimi *et al.*, 2016; Lanford *et al.*, 1999; Kiernan *et al.*, 2005a; Wang *et al.*, 2015) (Figure 22). En plus de la voie Notch, d'autres facteurs entrent également en ligne de compte pour la régulation de l'expression d'Atoh1. Sox2 par exemple, exprimé dans le domaine prosensoriel, se lie avec l'amplificateur (*enhancer*) d'Atoh1, favorisant son expression (Puligilla et Kelley, 2017). Mais Sox2 agit également comme antagoniste d'Atoh1 ; ce dernier mécanisme reste encore à élucider, mais il a été suggéré qu'il pourrait s'agir d'une boucle de feedback incohérente (*incoherent feedback loop*) (Neves *et al.*, 2012). Après une première étape de promotion, Atoh1 serait réprimé par l'expression d'une autre cible de Sox2 : Prox1 (*Prospero Homeobox 1*), un facteur de transcription spécifique aux cellules de soutien en différenciation (Dabdoub *et al.*, 2008; Kirjavainen *et al.*, 2008; Puligilla et Kelley, 2017). Prox1 agirait ainsi en synergie avec la voie Notch (Birmingham-McDonogh *et al.*, 2006; Dabdoub *et al.*, 2008).

Au niveau de la bordure interne du domaine prosensoriel, la modulation de la voie Notch par l'intermédiaire de Lnfg (*Lunatic Fringe*) et de Mnfg (*Manic Fringe*), des membres de la superfamille des glycosyltransférases, est suspectée de jouer un rôle majeur dans l'établissement de la différenciation de la cellule sensorielle interne (Basch *et al.*, 2016b). Une fois celle-ci entamée, cette cellule devient une source de Fgf8, un ligand de Fgfr3, qui va directement agir sur sa cellule voisine en induisant l'expression de Hey2. Ce dernier est un facteur de transcription appartenant à la famille des bHLH qui agira en synergie avec l'activation de la voie de signalisation Notch en réprimant l'expression d'Atoh1 (Doetzlhofer

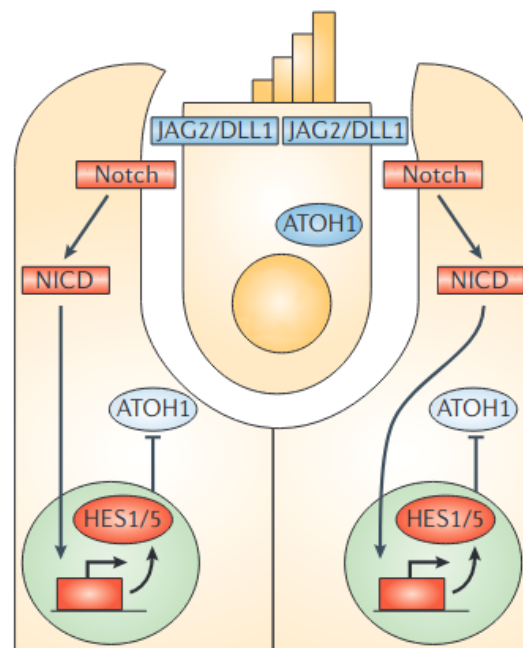


FIGURE 22 – Représentation schématique du mécanisme d'inhibition latérale par voie Notch dans l'établissement des lignées cellulaires sensorielles et de soutien. Repris et modifié depuis Kelley (2006).

*et al.*, 2009). Hey2 est ainsi nécessaire pour la différenciation des cellules piliers (Doetzlhofer *et al.*, 2009). Bmp4, toujours exprimé dans la partie externe du domaine prosensoriel, supprime l'action Fgf8, permettant aux cellules sous son influence de ne pas se développer en cellules piliers, mais en cellules sensorielles externes et en cellules de Deiters. Leur différenciation requiert l'activation de la voie de signalisation Fgf20/Fgfr1 (Puligilla *et al.*, 2007; Iizuka-Kogo, 2018)

Chez la souris, les cellules sensorielles internes en développement peuvent être identifiées par leur expression d'une myosine non-conventionnelle, Myo6, aux alentours de E15 et sur base de leur morphologie peu de temps après (Iizuka-Kogo, 2018; Roux *et al.*, 2009; Rubel, 1978). Ces cellules possèdent un noyau de taille importante et montrent également une accumulation d'actine au niveau de leurs parois latérales (Kelley, 2007; Rubel, 1978). Les cellules sensorielles externes en développement peuvent être observées vers E16. La forme des cellules sensorielles en développement est initialement cylindrique avec un élargissement de la région basale

résultant de la relative grande taille de leur noyau (Pujol *et al.*, 1998). Les cellules sensorielles internes conserveront cette morphologie piriforme tandis que l'élargissement basal disparaîtra durant le développement des cellules sensorielles externes. Les cellules de Deiters ainsi que les cellules piliers apparaîtraient également aux alentours de E16. Néanmoins, dû au laps de temps relativement court entre l'apparition des différents types cellulaires, il est assez difficile de déterminer quelles sont les cellules qui apparaissent les premières (Kelley, 2007).

Au cours du développement, la différenciation cellulaire s'opérerait en une vague qui se déplacerait le long de l'axe médullo-latéral. Un gradient de différenciation existe également le long de l'axe base-apex. Toutefois, l'origine exacte de la différenciation reste sujette à controverse : certains auteurs la localisent à l'extrême base du canal cochléaire, dans la région du crochet<sup>23</sup> (Kaltenbach et Falzarano, 1994) ; d'autres la situent dans la partie médio-basale du canal cochléaire avec pour conséquence l'établissement d'un gradient de différenciation supplémentaire se dirigeant vers la région du crochet (Anniko, 1983; Bredberg, 1968; Kelley, 2007; Lim et Anniko, 1985; Roth et Bruns, 1992b).

D'après les travaux de McKenzie *et al.* (2004), les cellules sensorielles entameraient leur différenciation à une distance de 10 à 15  $\mu\text{m}$  de leur emplacement définitif. Cette observation suggère que des mouvements cellulaires pourraient avoir lieu afin de faciliter les arrangements finaux au sein de l'organe de Corti. En effet, durant son développement, l'épithélium sensoriel auditif va subir de profond changement en subissant notamment une extension convergente selon l'axe base-apex. Ce mécanisme qui permet l'allongement du tissu est en grande partie contrôlé par les voies de signalisation PCP (Wang *et al.*, 2005; Montcouquiol et Kelley, 2003; Montcouquiol *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2009). En revanche, les processus qui permettent le passage d'un épithélium pseudostratifié à un épithélium sensoriel simple à bistratifié ne sont pas encore connus (Iizuka-Kogo, 2018).

À partir de E17 chez la souris, les différents types cellulaires qui composent l'organe de Corti sont tous reconnaissables et ce, sur toute la longueur du canal cochléaire, de la base jusqu'à l'apex (Kelley, 2007). Chaque cellule sensorielle interne est séparée de la sensorielle interne voisine par une cellule phalangée. À ce stade, la partie apicale de la cellule phalangée est encore

---

<sup>23</sup>Nommée *hook* dans la littérature anglophone

en contact avec la lumière du canal cochléaire. Néanmoins, durant le développement, la partie apicale de la cellule pilier interne va s'étendre de façon à recouvrir la cellule phalangée, jusqu'à venir au contact de la cellule sensorielle interne. La cellule pilier externe sera également en partie recouverte par la partie apicale de la cellule pilier interne durant les premiers jours post-nataux (Roth et Bruns, 1992b).

L'ouverture du tunnel de Corti commence peu après la naissance : dès le premier jour post-natal chez le chat, au quatrième jour post-natal (P4) chez la gerbille et aux environs du huitième jour post-natal (P8) chez le rat (Ito *et al.*, 1995; Roth et Bruns, 1992b; Sato *et al.*, 1999). L'ouverture des espaces de Nuel suit de près celle du tunnel de Corti.

Durant la période post-natale, la maturation des cellules sensorielles est caractérisée par une diminution du nombre d'organites dans leur cytoplasme ainsi que par la maturation du cytosquelette des stéréocils qui serait atteinte aux alentours de P11 chez le rat (Pujol *et al.*, 1998; Roth et Bruns, 1992b; Vago *et al.*, 1996). La membrane tectoriale est parfaitement constituée dès P12 tandis que les cellules de Hensen, les cellules de Claudius et les cellules de Böttcher poursuivront leur différenciation jusqu'à P24 (Cloes *et al.*, 2013; Roth et Bruns, 1992b; Rueda *et al.*, 1996).

D'après Pujol et Hilding (1973), chez la plupart des mammifères, l'organe de Corti ne serait réellement mature que 10 à 14 jours après le début de la fonction auditive.

## 5 | Le cytosquelette

Comme décrit dans les sections 2.2.2.3 et 2.2.2.4, les cellules qui composent l'organe de Corti présentent une architecture cellulaire et une morphologie ultrastructurale très particulières. Les stéréocils et la plaque cuticulaire des cellules sensorielles, les prolongements filiformes des cellules de Deiters ou encore les très nombreux faisceaux de microtubules des cellules piliers en sont des exemples caractéristiques. Ceux-ci sont constitués par des réseaux complexes de filaments protéiques qui composent le cytosquelette de ces cellules.

### 5.1 Généralités

Le cytosquelette des cellules eucaryotes est composé par 3 types de filaments cellulaires, classés en fonction de leur diamètre :

- *les microfilaments d'actine* : il s'agit des plus petits filaments avec un diamètre d'environ 7 nm ;
- *les microtubules* : le plus large constituant du cytosquelette, ils possèdent un diamètre d'environ 25 nm ;
- *les filaments intermédiaires* : ils possèdent un diamètre intermédiaire aux précédents, un peu près 10 nm.

Chacun de ces filaments se compose de constituants qui leur sont propres formant des polymères aux longueurs et structures variables, adaptées en fonction des besoins de la cellule (Fletcher et Mullins, 2010).

## 5.2 Microfilaments d'actine

L'actine est impliquée dans de très nombreux phénomènes cellulaires : transport intracellulaire, jonctions cellulaires, formation de réseaux associés à la membrane plasmique, contraction musculaire, migration cellulaire, endocytose et exocytose ou encore cytokinèse (Pollard, 2016).

Chaque eucaryote possède au moins un gène codant pour l'actine. Cette protéine cytoplasmique comprend deux domaines entre lesquels se trouve un site de liaison à l'ATP (*Adénosine Tri-Phosphate*) ou à l'ADP (*Adénosine Di-Phosphate*) (Pollard, 2016). Sur base de variation en résidus acides au niveau de l'extrémité N-terminale de sa chaîne polypeptidique, l'actine est classée en trois isoformes : l'actine  $\alpha$ , l'actine  $\beta$  et l'actine  $\gamma$ . L'expression de ces différentes isoformes varie en fonction du tissu (Pollard, 2016).

Au sein de la cellule, l'actine se présente sous une forme monomérique dite globulaire, l'actine G, qui peut se polymériser sous une forme filamenteuse, l'actine F. Cette polymérisation est constituée de trois phases (Figure 23) :

- *la nucléation* : cette première étape comprend la formation d'un oligomère stable à partir d'actine G activée, liée à un ATP. Cet oligomère constitue le noyau de polymérisation.
- *l'élongation* : durant cette phase, les noyaux de polymérisation sont rapidement allongés par addition de monomères sur chacune des deux extrémités des noyaux.
- *l'état stationnaire* : les filaments d'actine formés sont dans un état constant de polymérisation - dépolymérisation (Lodish *et al.*, 2000).

À l'état stationnaire, les microfilaments d'actine présentent deux extrémités distinctes : une extrémité barbue, chargée positivement, et une extrémité pointue, chargée négativement. Les monomères d'actine G activée sont préférentiellement additionnés à l'extrémité barbue. L'ATP est progressivement hydrolysé en ADP, permettant la stabilisation du filament d'actine F. La dépolymérisation a préférentiellement lieu au niveau de l'extrémité pointue (Winder et Ayscough, 2005).

La polymérisation des microfilaments d'actine ainsi que leur dynamique sont régulées par de nombreuses protéines associées à l'actine, les ABPs (*Actin Binding Protein*) (dos

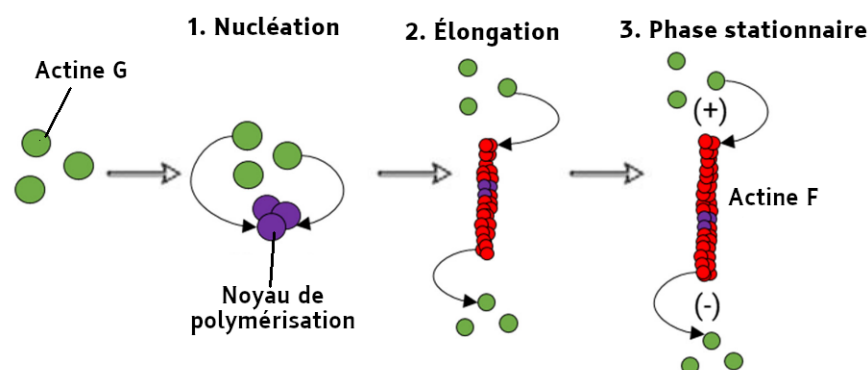


FIGURE 23 – Représentation des différentes phases de la polymérisation de l'actine G *in vitro*. Repris et modifié depuis Muñoz-Lasso *et al.* (2020).

Remedios *et al.*, 2003). Certaines de ces ABPs, attachées à la famille des myosines utilisent les microfilaments d'actine comme des rails sur lesquels elles peuvent se déplacer. Ces protéines jouent un rôle très important dans le maintien des stéréocils des cellules sensorielles de l'organe de Corti en participant au contrôle de leur taille et de leur forme par exemple (dos Remedios *et al.*, 2003; Nayak *et al.*, 2007).

Au sein des cellules de soutien, les microfilaments d'actine jouent également un rôle essentiel dans la rigidité des cellules en association avec les nombreux microtubules qu'elles comportent. En l'absence d'actine, la valeur du module de Young de la cellule pilier externe est divisée par trois, illustrant sa perte de rigidité (Tolomeo et Holley, 1997). D'autre part, l'absence d'une ABP qui participe au remaniement des microfilaments d'actine, la protéine Vasp (*Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein*), implique un retard dans la formation du cytosquelette de la cellule pilier externe, provoquant ainsi un retard dans la mise en place de l'audition (Schick *et al.*, 2007).

### 5.3 Les microtubules

À l'instar de l'actine, les tubulines font partie d'une grande famille de gènes bien conservés au sein des eucaryotes (Nogales, 2000). Ces sous-unités protéiques s'assemblent pour former des hétérodimères qui constitueront l'unité de base des microtubules. La super famille des tubulines inclut les tubulines  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\zeta$ ,  $\theta$ ,  $\iota$  et  $\kappa$  (Ludueña, 2013). Chez les vertébrés,

les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  s'assemblent pour former les hétérodimères à l'origine des microtubules. La tubuline  $\gamma$  est quant à elle localisée au niveau des centres organisateurs des microtubules (*MicroTubule Organizing Center*, MTOC) et impliquée dans l'initiation de la polymérisation des microtubules. Les tubulines  $\delta$  et  $\epsilon$  sont localisées au niveau du centrosome et des corps basaux et jouent un rôle important dans la formation des triplets de microtubules. Les fonctions et particularités des autres tubulines retrouvées en partie chez les animaux et les protistes restent encore à déterminer (Ludueña, 2013).

Les structures secondaires et tertiaires des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  comprennent trois domaines semblables. Le domaine C-terminal localisé à la surface de la protéine et du microtubule est important pour les interactions entre les monomères ainsi qu'avec les protéines associées aux microtubules (*Microtubule Associated Proteins*, MAP). Le domaine intermédiaire est impliqué dans la polymérisation des hétérodimères grâce aux contacts latéraux. Le domaine N-terminal se lie quant à lui au GTP ; échangeable pour la tubuline  $\beta$  et non échangeable pour la tubuline  $\alpha$  (Nogales *et al.*, 1999; Nogales et Wang, 2006; Wade, 2009).

*In vitro*, les hétérodimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  sont capables de s'auto-assembler, en présence de GTP et de magnésium (Wade, 2009). Ces derniers s'associent longitudinalement pour former un protofilament. De très nombreux protofilaments s'associent alors entre eux latéralement pour former le tube creux qu'est le microtubule. *In vitro*, 11 à 16 protofilaments peuvent s'associer latéralement. Chez les mammifères, ce sont 13 protofilaments qui s'associent dans la grande majorité des cas ; les cellules de soutien de l'organe de Corti étant un rare exemple où des microtubules stables à 15 protofilaments peuvent être observés. L'association ordonnée des hétérodimères confère une polarité aux microtubules : l'extrémité positive laisse apparaître une tubuline  $\beta$  tandis que l'extrémité négative laisse apparaître une tubuline  $\alpha$ . Des vitesses de polymérisation différentes sont observées aux deux extrémités, avec une cinétique plus rapide au niveau de l'extrémité positive (Wade, 2009) (Figure 24).

*In vivo*, les cellules possèdent des sites de nucléation spécialisés qui se trouvent majoritairement au niveau des MTOCs. La tubuline  $\gamma$ , en association avec d'autres protéines, forme un complexe circulaire de tubuline  $\gamma$  ( *$\gamma$ -Tubulin Ring Complex*,  $\gamma$ TuRC) (Haren Ingrid Bazin et Rémy, 2006). La croissance des microtubules s'accompagne de l'hydrolyse

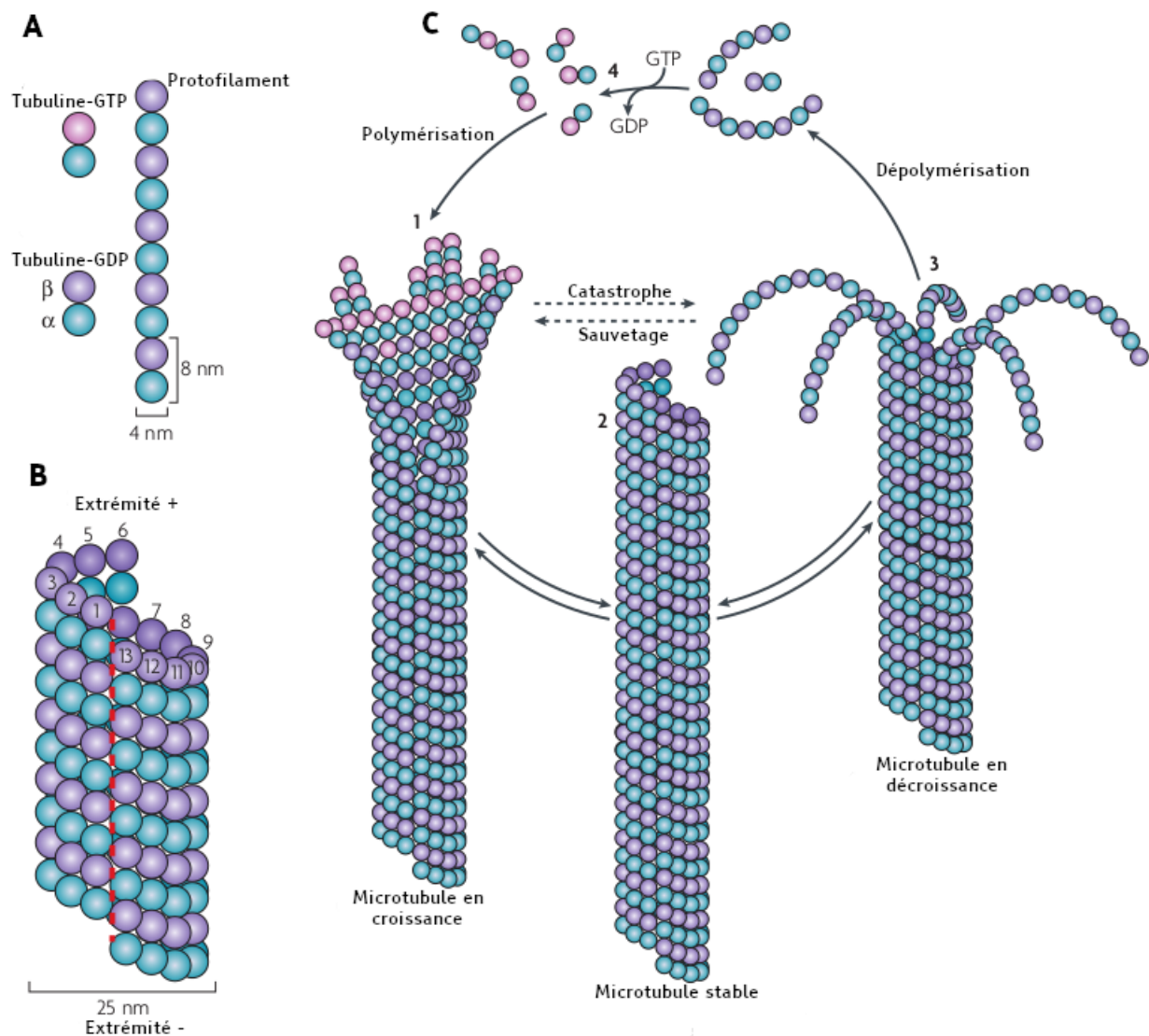


FIGURE 24 – Représentation de la polymérisation des microtubules. A : hétérodimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  associés en protofilament. B : le cylindre creux que forme le microtubule est composé par l'assemblage d'hétérodimères, créant une structure polarisée. C : polymérisation et dépolymérisation des microtubules. Repris et modifié depuis Akhmanova et Steinmetz (2008).

du GTP lié à la tubuline  $\beta$ . Une coiffe de GTP persiste ainsi au niveau de l'extrémité en croissance. L'hydrolyse de cette coiffe de GTP déstabilise le microtubule et provoque sa rapide dépolymérisation. Cette dépolymérisation rapide porte le nom de *catastrophe* (Gardner *et al.*, 2013).

La majorité des eucaryotes présente plusieurs gènes codant pour les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ . Selon l'organisme étudié, la présence de différents isotypes peut amener une capacité à s'adapter à

des changements environnementaux, comme c'est notamment le cas chez *Arabidopsis thaliana*, l'arabette de Thalius : en fonction de la température, différents isotypes de la tubuline  $\beta$  sont exprimés permettant la survie de la plante dans des milieux variés (Chu Boyang *et al.*, 1993). La présence d'isotypes différents selon le rôle joué par la cellule peut également s'avérer essentiel : les neurones mécanosensoriels du vers nématode *Caenorhabditis elegans* contiennent des microtubules à 15 protofilaments. Ces derniers nécessitent l'expression des deux isotypes absents des cellules somatiques, MEC-12 (*MEChanosensory abnormality*) et MEC-7, une tubuline  $\alpha$  et une tubuline  $\beta$  respectivement. Ces deux isotypes sont essentiels pour la structure des neurones mécanosensoriels et également dans leurs fonctions. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces rôles restent encore à déterminer (Chalfie, 2009; Savage *et al.*, 1989; Wade, 2009). Chez les vertébrés, il existe sept classes d'isotypes de tubuline  $\alpha$  et six classes d'isotypes de tubuline  $\beta$ . La localisation de ces différents isotypes varie non seulement en fonction des tissus, mais également selon leur emplacement au sein même des cellules (Ludueña, 2013).

La dynamique des microtubules ainsi que les interactions qu'ils possèdent avec les MAPs peuvent être régulées par différents types de modifications post-traductionnelles prenant place sur la tubuline  $\alpha$  ou la tubuline  $\beta$ , voire les deux simultanément. Nous pouvons ainsi citer la polyglycylation, la polyglutamylolation, la tyrosination/détyrosination ou encore la tubuline  $\delta 2$ . L'acétylation est la seule modification post-traductionnelle qui ne s'effectue pas au niveau de l'extrémité C-terminale des tubulines (Westermann et Weber, 2003).

L'acétylation de la tubuline  $\alpha$  s'effectue sur la lysine en position 40. Chez la souris, l'acétyltransférase  $\alpha$ -TAT1 est la principale responsable de l'acétylation de la tubuline  $\alpha$ . La disparition de tubuline  $\alpha$ -acétylée dans tous les tissus étudiés est relevée lorsque cette acétyltransférase est absente (Kalebic *et al.*, 2013). Cette modification post-traductionnelle s'effectue lentement dans la lumière des microtubules. Ce sont ainsi les microtubules stables qui montrent le plus cette acétylation. Le rôle exact de cette dernière reste encore à déterminer. Il a été néanmoins montré chez le vers nématode chez *Caenorhabditis elegans* que cette acétylation était nécessaire au maintien des microtubules à 15 protofilaments au sein des neurones mécanosensoriels. Le nombre de protofilaments par microtubule varie alors entre

10 et 16 (Cueva *et al.*, 2012; Topalidou *et al.*, 2012).

Il existe de nombreuses MAPs qui permettent de réguler les microtubules ou encore de les utiliser comme rails pour se déplacer. Les plus connues sont les dynéines et les kinésines, protéines motrices qui permettent respectivement le déplacement rétrograde et antérograde. Il s'agit de protéines essentielles dans le transport d'organites, de vésicules ou encore de molécules complexes. Elles sont également indispensables au mouvement des cils et des flagelles (Bhabha *et al.*, 2016; Wade, 2009). D'autres MAPs jouent des rôles dans la fragmentation des microtubules (katanine, spastine), dans leur polymérisation/dépolymérisation (stathmine, *Plus-end Tracking Proteins*) ou dans leur stabilisation (MAP1, MAP2, Tau (*Tubulin associated unit*), *Stable Tubule Only Polypeptide*) (Bosc *et al.*, 1996; Conde et Cáceres, 2009; Mohan et John, 2015).

## 5.4 Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires constituent un groupe de protéines très hétérogènes par leur séquence et leur poids moléculaire. Malgré cette grande diversité, ils partagent tous une structure semblable : une région centrale en hélice  $\alpha$  encadrée par une tête N-terminale et une queue C-terminale variable. La région centrale en hélice  $\alpha$  est composée par la répétition de séquences de 7 acides aminés contenant 2 acides aminés apolaires. Ceux-ci provoquent la formation de surfaces hydrophobes favorables à la polymérisation de deux hélices  $\alpha$  en superhélice (Herrmann et Aebi, 2016; Kornreich *et al.*, 2015).

En fonction de la similarité de leur séquence, les filaments intermédiaires sont classés en six types. Le plus grand groupe est formé par les type I et II, respectivement les kératines acides et basiques. Ces filaments intermédiaires forment des hétéropolymères et sont spécifiques des tissus épithéliaux. Les filaments intermédiaires de type III englobent la vimentine, la desmine, les GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) et la périphérine. Ce type de filaments forme des homopolymères mais également des hétéropolymères avec les filaments de type III ou IV. Le type IV est constitué par la nestine, présente dans les cellules souches du système nerveux central, par l' $\alpha$  interconnexine et trois neurofilaments (NF-L, NF-M, NF-H; *Neurofilament Light, Medium, Heavy*) présents quant à eux dans les neurones. Les lamines constituent le type V.

Ces filaments se retrouvent exclusivement au niveau du noyau des cellules des métazoaires, formant un réseau qui supporte l'enveloppe nucléaire. La filensine et la phakinine observées dans la cornée de l'oeil représentent le type VI (Kornreich *et al.*, 2015).

Les filaments intermédiaires ne polymérisent pas par ajout de monomères aux extrémités du filament, mais par ajout d'ULF (*Unité de Longueur du Filament*) (Herrmann et Aebi, 2016). À l'exception des filaments intermédiaires du type V, les ULF s'assemblent de la manière suivante : deux monomères s'associent parallèlement pour former un dimère. Ces derniers s'associent ensuite de façon antiparallèle pour former un tétramère. Huit tétramères se groupent alors latéralement pour former un ULF (Kornreich *et al.*, 2015). D'un diamètre de 16 nm et d'une longueur de 60 nm, les ULF s'emboîtent longitudinalement pour former un filament. Après élongation du filament, celui-ci se compacte, ce qui réduit son diamètre à approximativement 10 nm (Figure 25).<sup>24</sup>

Les filaments intermédiaires participent à de nombreuses fonctions telles que l'apport d'un support mécanique, la croissance et la régénération tissulaire, la survie cellulaire, l'apoptose, le transport de protéine ou encore l'adhésion cellulaire (Dey *et al.*, 2014). Ils participent notamment à l'intégrité mécanique de la cellule en interagissant avec d'autres fibres cytosquelettiques telles que l'actine et les microtubules. Ces interactions sont contrôlées par des protéines non-structurales comme des kinases et des phosphatases (Dey *et al.*, 2014; Lammerding *et al.*, 2004). Les filaments intermédiaires ont également un rôle important dans le transport et la distribution des vésicules : la vimentine, par exemple, participe activement au transport des lysosomes au sein de la cellule (Styers *et al.*, 2005). Leur association avec les desmosomes et les hémidesmosomes par l'intermédiaire de protéines accessoires telles que la caténine- $\gamma$ , la desmoplakine ou la plectine, est très importante dans la cohésion cellule - cellule et dans la cohésion du tissu avec la matrice extracellulaire (Thiry *et al.*, 2019).

---

<sup>24</sup>Les filaments intermédiaires ne possèdent pas de polarité, les ULF étant symétriques (Herrmann *et al.*, 2009a).

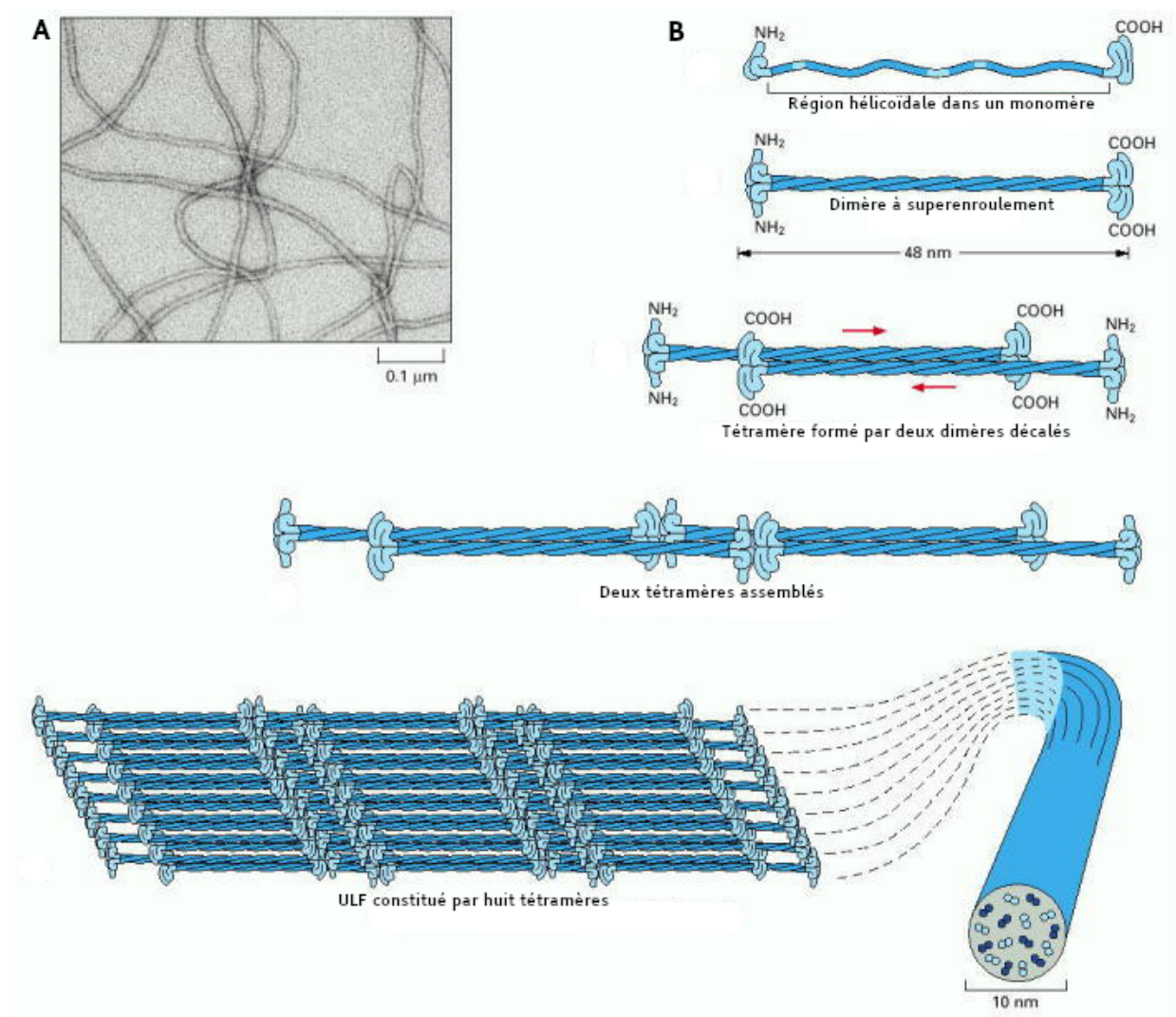


FIGURE 25 – Représentation des filaments intermédiaires et de leur polymérisation. A : photographie en microscopie électronique à transmission de filaments intermédiaires. B : polymérisation des filaments intermédiaires. Repris et modifié depuis Alberts *et al.* (2002).



## 6 | Transition

# épithélio-mésenchymateuse

Nous avons vu que, durant sa morphogenèse, l'épithélium du canal cochléaire évoluait depuis un épithélium pseudostratifié vers un épithélium complexe, alternant le simplement stratifié et le bistratifié (voir 4.2 et 4.3). De plus, une mosaïque extrêmement régulière, composée par les cellules sensorielles et les cellules de soutien, doit également se mettre en place avant que l'organe sensoriel ne devienne fonctionnel. Ces modifications morphologiques de l'épithélium du canal cochléaire en développement impliquent une plasticité des cellules épithéliales qui doivent ainsi être capables d'une certaine liberté de mouvement (Thiery *et al.*, 2010). Cette plasticité des épithéliums durant leur morphogenèse est notamment permise par un mécanisme appelé transition épithélio-mésenchymateuse.

### 6.1 Différences entre cellules épithéliales et cellules mésenchymateuses

#### 6.1.1 Les épithéliums

Les tissus épithéliaux, qu'ils soient de revêtement ou glandulaires, sont constitués presque exclusivement par des cellules aux formes simples et régulières qui possèdent une polarité très marquée suivant l'axe base-apex. Étroitement juxtaposées, les cellules épithéliales sont solidarisées par des jonctions intercellulaires qui permettent une grande cohésion tissulaire et d'importantes interactions de cellule à cellule. À de rares exceptions près, les épithéliums

sont dépourvus de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Leur nutrition est alors assurée par les capillaires des tissus conjonctifs dont ils sont séparés par une fine structure acellulaire, la membrane basale, à travers laquelle les métabolites diffusent. Cette membrane fournit un support structural aux épithéliums par l'intermédiaire des hémidesmosomes. Ces derniers permettent l'ancrage du cytosquelette de la cellule sur la membrane basale, grâce à la présence d'intégrines, protéines transmembranaires qui interagissent avec des constituants de la matrice extracellulaire (Thiry *et al.*, 2019).

Au sein du tissu épithélial, les interactions cellule-cellule et cellule-matrice sont indispensables. Elles comprennent, par exemple, la transmission de signaux qui peuvent influencer le comportement cellulaire ou simplement donner des informations quant à l'identité de la cellule. Elles comprennent également la formation de contacts stables entre cellules voisines ou entre cellule et matrice extracellulaire. Parmi les molécules intervenant dans ces interactions, citons notamment les CAM (*Cell Adhesion Molecules*) qui jouent un rôle important dans l'adhérence cellulaire. Ces molécules d'adhérences sont des glycoprotéines transmembranaires qui appartiennent à quatre superfamilles : les cadhérines, les immunoglobulines, les intégrines et les sélectines. En plus de ces molécules d'adhérence, la cohésion tissulaire est assurée par la présence de systèmes de jonctions (Thiry *et al.*, 2019) (Figure 26).

Au niveau des faces intercellulaires des cellules épithéliales, les différents types de jonctions intercellulaires sont :

- **Les jonctions serrées** : elles sont caractérisées par la présence de plusieurs points de contact entre deux cellules adjacentes menant ainsi à un rétrécissement drastique de l'espace intercellulaire qui, au sein d'un épithélium, est d'habituellement de 20 nm. Ceinturant la cellule, cette barrière est constituée par des protéines transmembranaires telles que les claudines, les occludines et les JAM (*Junctional Adhesion Molecule*), une sous-famille des immunoglobulines. Ces protéines sont liées avec des protéines intracellulaires comme ZO-1 et ZO-2 (*Zonula Occludens*) qui sont elles-mêmes liées aux microfilaments d'actine composant le cytosquelette. En plus de participer à l'adhérence entre des cellules adjacentes, ces jonctions étanches permettent la régulation du flux

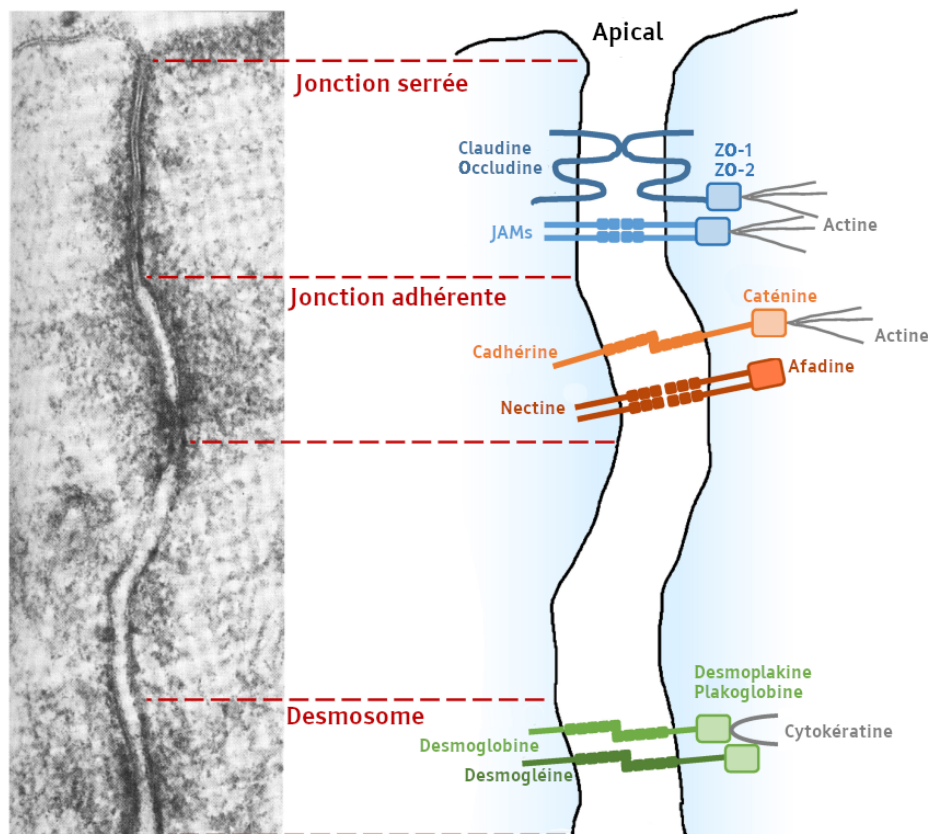


FIGURE 26 – Représentation schématique de jonctions intercellulaires entre deux cellules épithéliales. À gauche, une photographie en microscopie électronique illustrant les jonctions intercellulaires. À droite, le schéma correspondant. Repris et modifié depuis Golovkine *et al.* (2018).

de molécules à travers l'espace paracellulaire autorisant ainsi les cellules à effectuer un tri sélectif dans les molécules amenées à traverser l'épithélium. Il permet également la définition de deux domaines membranaires, apical et basolatéral, déterminants dans la polarisation de la cellule (Thiry *et al.*, 2019). Les complexes PAR (*Partitioning-defective 1*), Crumbs et Scribble sont notamment responsables de la régulation de la polarité cellulaire. En association avec un groupe de molécules de signalisation, les Rho GTPases, les complexes de polarité régulent le transport des vésicules polarisées le long des filaments du cytosquelette (Garcin et Straube, 2019).

- **Les jonctions adhérentes** : ces jonctions intercellulaires constituent de véritables points d'ancrage au cytosquelette de chaque cellule. Ainsi, le cytosquelette d'une cellule est lié à celui de sa voisine, ce qui permet véritablement de donner au tissu une unité structurale

cohérente. Deux types de jonctions adhérentes sont distinguées : les *zonula adherens* et les desmosomes. Dans les *zonula*, les liaisons intercellulaires sont assurées par des glycoprotéines transmembranaires à longs domaines extracellulaires de la superfamille des cadhérines. Ces dernières sont liées aux microfilaments d'actine du cytosquelette grâce à des protéines d'association : des caténine- $\alpha$  et - $\beta$ . Les desmosomes sont des structures discoïdes d'environ 0,3  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les cadhérines impliquées dans les liaisons intercellulaires sont ici liées aux filaments intermédiaires du cytosquelette grâce à des protéines telles que la caténine- $\gamma$  et la desmoplakine. (Thiry *et al.*, 2019).

- **Les jonctions communicantes** : nommées également *nexus* ou encore *gap junction*, elles sont formées par de petits canaux intercellulaires qui permettent le passage direct d'ions et de petites molécules ainsi que la transmission de signaux entre des cellules voisines. Ces petits canaux intercellulaires sont constitués par le rapprochement de deux demi-canaux (connexons) intégrés aux membranes de cellules adjacentes. Chaque connexon est quant à lui formé par six sous-unités protéiques transmembranaires appartenant à la famille des connexines.

Les systèmes de jonctions adhérentes et communicantes ne sont pas une exclusivité des tissus épithéliaux. Cependant, l'association de jonctions serrées, de *zonula adherens* et parfois de desmosomes, forme un complexe de jonctions, une caractéristique propre aux épithéliums (Thiry *et al.*, 2019).

### 6.1.2 Le mésenchyme

Le mésenchyme désigne un tissu conjonctif embryonnaire dérivant du mésoderme qui possède la capacité de se différencier en une large variété de types cellulaires (Porcellini, 2009). Il possède un rôle mécanique en tant que tissu de soutien ainsi qu'un rôle métabolique assurant la nutrition et l'échange entre deux tissus. L'organisation structurale des cellules mésenchymateuses diffère de celle des cellules épithéliales par plusieurs points :

- elles ne présentent pas de jonctions intercellulaires qui autorisent une organisation continue entre elles ;
- en dehors des phases migratoires, la polarisation cellulaire est moins marquée et les

organites semblent distribués de manière aléatoire ;

- elles ne possèdent que de rares contacts avec les autres cellules ;
- elles ne reposent pas sur une membrane basale ;
- la vimentine est la protéine qui constitue les filaments intermédiaires<sup>25</sup>.

La grande caractéristique des cellules mésenchymateuses réside dans leur plasticité qui permet la migration cellulaire : la cellule commence par émettre une extension cytoplasmique<sup>26</sup> sous l'effet de la polymérisation de l'actine corticale (Theveneau et David, 2014). Une fois formée, cette extension s'ancre au substrat grâce à des intégrines, s'il s'agit d'une matrice extracellulaire, ou par des molécules d'adhérence cellule-cellule comme les cadhérines, si le substrat venait à être une autre cellule (Theveneau et Mayor, 2012; Wehrle-Haller, 2012). La contraction du cytosquelette d'actomyosine assure ensuite le déplacement cellulaire par traction sur les adhérences focales et rétraction de l'arrière de la cellule qui, quant à elle, se détache du substrat. Afin d'être efficaces, ces processus doivent être polarisés. De plus, la migration cellulaire requiert la sécrétion d'enzymes protéolytiques détruisant la matrice extracellulaire (Ridley, 2011; Wehrle-Haller, 2012). Durant le développement ou la progression tumorale, le mésenchyme peut se présenter comme un état intermédiaire de la formation d'un tissu épithélial à partir d'un autre tissu épithélial. Il s'agit dès lors d'une transition épithélio-mésenchymateuse (Gonzalez et Medici, 2014).

## 6.2 Transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse (*Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT*) est un phénomène biologique dynamique durant lequel les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales et acquièrent un phénotype de cellules mésenchymateuses. Cette transition est associée à l'acquisition d'une capacité migratoire ainsi qu'à une augmentation de production de composants de la matrice extra-cellulaire (Mezni *et al.*, 2015). Chez les eumétazoaires, l'EMT est essentiel durant de nombreux processus de développement embryonnaire, de

---

<sup>25</sup>La vimentine constitue également les filaments intermédiaires des cellules endothéliales (Dave et Bayless, 2014)

<sup>26</sup>Cette extension cytoplasmique peut être un filopode, un lamellipode ou encore un pseudopode (Theveneau et David, 2014)

régénération cellulaire et de cicatrisation. Il joue également un rôle important dans certaines pathologies cancéreuses et dans leur résistance à différents traitements médicaux (Thiery *et al.*, 2009). Le processus inverse, la transition mésenchymo-épithéliale (*Mesenchymal-Epithelial Transition, MET*) existe également et va souvent de pair avec l'EMT durant le développement embryonnaire (Nieto, 2013). L'organogenèse du foie, du pancréas, des valves cardiaques et ainsi que la formation du palais, par exemple, nécessitent plusieurs cycles alternant entre EMT et MET (Ahmed *et al.*, 2007; Johansson et Grapin-Botton, 2002; Tanimizu et Miyajima, 2007).

En fonction du rôle qu'elle joue, l'EMT peut-être classée en trois sous-types (Kalluri et Weinberg, 2009) :

- *Type 1* : EMT associée au développement embryonnaire ;
- *Type 2* : EMT impliquée dans la régénération tissulaire, la cicatrisation, l'inflammation et la fibrose ;
- *Type 3* : EMT qui concerne la conversion de cellules épithéliales cancéreuses en cellules invasives aux capacités métastatiques.

La transition d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux nécessite de très nombreuses modifications à la fois intracellulaires et intercellulaires, architecturales et fonctionnelles. Une EMT complète est rarement observée. En fonction des cellules impliquées et du sous-type auquel elle se rapporte, une EMT présente un spectre de marqueurs qui la placeront sur un axe imaginaire entre les phénotypes épithélial et mésenchymateux (Gonzalez et Medici, 2014). Ces modifications incluent dans un premier temps, la perte de caractéristiques épithéliales telles que les systèmes de jonctions, la polarisation de la cellule et de ses organites ou encore de l'organisation de son cytosquelette, et dans un second temps, l'apparition de marqueurs mésenchymateux et de facteurs pro-invasifs (Kalluri et Weinberg, 2009; Savagner, 2010) (Figure 27).

L'activation et l'expression des facteurs de transcription induisant une EMT dépendent d'une pléthore de voies de signalisation<sup>27</sup> telles que *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), *Bone Morphogenetic Protein* (BMP), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), *Wnt*, *Sonic Hedgehog* (Shh), *Notch* ou encore

---

<sup>27</sup>La détermination de la voie utilisée dépend du contexte cellulaire ainsi que du sous-type d'EMT (Thiery *et al.*, 2009).

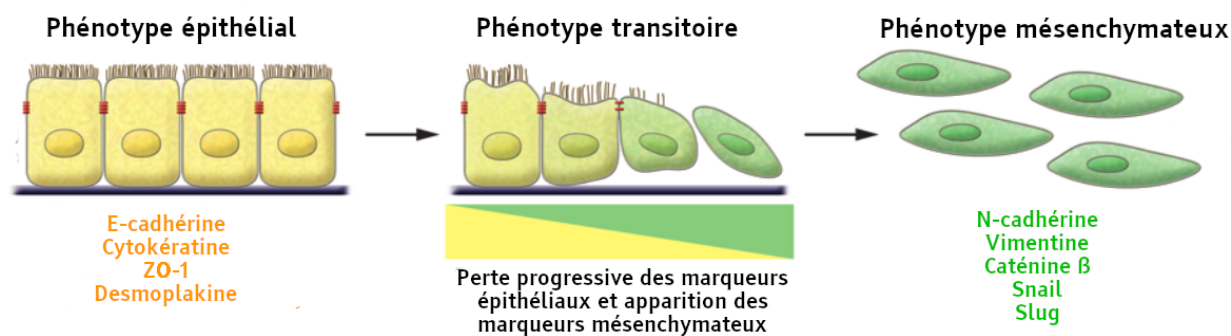


FIGURE 27 – Représentation schématique d’une transition épithélio-mésenchymateuse. Les principaux marqueurs des différents phénotypes sont illustrés. Repris et modifié depuis Kalluri et Weinberg (2009).

la signalisation médiée par les intégrines (Al Moustafa *et al.*, 2012; Espinoza et Miele, 2013; Heldin *et al.*, 2012; Katoh et Katoh, 2009; McCormack et O’Dea, 2013; Taipale et Beachy, 2001).

Les marqueurs les plus communément utilisés dans la caractérisation du phénomène de l’EMT englobent notamment une diminution de l’expression de l’E-cadhérine provoquée par l’induction de facteurs de transcription tels que Snail1 ou Snail2 ainsi qu’une relocalisation de la caténine- $\beta$  dans le noyau (Lee *et al.*, 2006a). Cette dernière, en s’associant avec les co-facteurs de transcription LEF/TCF, induirait l’expression de vimentine, un constituant des filaments intermédiaires de type III exprimé principalement dans les cellules d’origine mésenchymateuses (Franke *et al.*, 1982).

La vimentine est une protéine multifonctionnelle très bien conservée dans l’évolution chez vertébrés. Si son rôle dans la plasticité des cellules mésenchymateuses ainsi que dans la migration cellulaire est connu depuis longtemps, il y a encore peu d’information quant aux mécanismes moléculaires qui supportent ces fonctions (Battaglia *et al.*, 2018). Capable d’interagir avec les microtubules et les protéines motrices associées aux microtubules, le réseau de filaments intermédiaires de vimentine jouerait un rôle dans le guidage et le maintien de la polarité des microtubules labiles (Gan *et al.*, 2016; Helfand *et al.*, 2002). Les filaments intermédiaires de vimentine participent également à la réorganisation des microfilaments d’actine durant la migration notamment par une interaction indirecte avec la plectine, une protéine de la famille des plakines (Svitkina *et al.*, 1996).



## 7 | Objectifs généraux

Malgré une littérature abondante sur le sujet, le développement de l'organe de Corti présente de nombreuses inconnues, notamment en ce qui concerne le développement et la différenciation morphologique du domaine prosensoriel et, surtout, des cellules de soutien. Ces dernières, pourtant, ne manquent pas de présenter des propriétés morphologiques particulières. De plus, elles sont à la base de l'architecture caractéristique de l'organe de Corti. Ainsi, durant le développement, est-il possible de discriminer la grande crête épithéliale et la petite crête épithéliale autrement que par le nombre de couches de noyaux visibles? Et lorsque la différenciation au sein du domaine prosensoriel aura débuté, est-ce que les cellules de soutien peuvent être distinguées sur base de caractéristiques morphologiques qui leur sont propres? Y a-t-il un mécanisme qui explique la transformation radicale que subit l'épithélium prosensoriel pseudostratifié durant son développement en organe de Corti? Comment l'important cytosquelette des cellules de soutien se met-il en place? Ce sont des exemples de questions auxquelles nous tenterons d'apporter une réponse.

Dans ce travail, afin d'étudier dans le détail les différents événements qui rythment le développement des cellules de soutien, nous ne pouvons pas nous contenter pas d'observations ponctuelles. Le développement de l'organe de Corti sera ainsi étudié systématiquement sur un modèle murin, depuis les stades embryonnaires jusqu'à l'apparition de la fonction auditive.

Dans un premier temps, une étude morphologique pointue, basée sur l'observation aux microscopes optique et électronique à transmission, sera effectuée. Celle-ci sera complétée par la mise en évidence sur notre matériel, par l'application de techniques cytochimiques et de marquages en immunofluorescence, de différentes structures et protéines qui nous permettront non seulement d'identifier les différents types cellulaires de l'organe sensoriel en formation,

mais également d'en étudier la dynamique.

Dans un second temps, nous vérifierons la possible implication d'une EMT (voir 6.2) durant le remodelage de l'épithélium sensoriel qui prend place durant les stades postnataux. Durant cette période, nous analyserons également la répartition spatio-temporelle de différents isotopes de tubuline au sein même des cellules de soutien en développement.

Pour terminer, nous compléterons notre étude des cellules de soutien durant le développement de l'organe de Corti par l'analyse de leur cytosquelette de microtubules à 15 protofilaments. En mettant en évidence les protofilaments, par une méthode cytochimique utilisant l'acide tannique comme mordant, nous pourrions analyser la mise en place de ces microtubules à 15 protofilaments. De plus, par l'étude d'une souris mutante invalidée pour l'acétyltransférase *Atat1*, une enzyme connue pour acétyler la tubuline  $\alpha$ , nous pourrions vérifier si l'acétylation de la tubuline joue effectivement un rôle dans la constitution des microtubules à 15 protofilaments.





## II | Résultats

---

*If it looks like a duck, and quacks like a duck, we have at least to consider the possibility that we have a small aquatic bird of the family anatidae on our hands.*

— Douglas Adams



## 8 | Identification précoce de la cellule pilier interne durant le développement de l'organe de Corti

Comme décrit dans un précédent chapitre du présent ouvrage (voir 2.2.2.2), la structure de l'organe de Corti chez les mammifères matures est très bien connue. Néanmoins, la manière dont les différents types cellulaires se mettent en place durant le développement de cet organe sensoriel est encore loin d'être totalement élucidée. Il n'existe que très peu d'informations quant à la caractérisation morphologique du domaine prosensoriel. La distribution ainsi que le timing de l'expression de p27<sup>kip1</sup>, marqueur qui identifie la ZNPC (voir 4.2), suggèrent que le gradient de sortie de cycle cellulaire au sein du canal cochléaire joue un rôle prépondérant dans la limitation du nombre de cellules progénitrices (Lee *et al.*, 2006b). Cependant, la localisation précise de la ZNPC en regard du GER et du LER n'a jamais été réellement déterminée (Chen et Segil, 1999). Le positionnement exact entre les deux crêtes épithéliales de la mosaïque cellulaire formant l'organe de Corti reste également à éclaircir (voir 4.3). D'autre part, les cellules de soutien en développement peuvent-elle être morphologiquement distinguées ? Ou est-il nécessaire d'attendre la différenciation des cellules sensorielles pour les discriminer ?

Nous avons dès lors décidé d'étudier le développement embryonnaire du canal cochléaire chez le rat de façon systématique entre E16 et E19. Une étude morphologique du développement du canal cochléaire et de l'organe de Corti en formation sera effectuée en microscopie optique et électronique à transmission. Afin de pouvoir identifier la ZNPC et les cellules de l'organe de Corti durant les différents stades, nous aurons recours aux méthodes

de marquages en immunofluorescence et à l'utilisation de marqueurs connus tels que p27<sup>kip1</sup> pour la ZNPC, Myo6 pour les cellules sensorielles, p75<sup>ngfr</sup> pour les cellules piliers ou encore la phalloïdine pour les filaments d'actine par exemple.

Sur base de nos observations, nous démontrons ainsi que, chez le rat, l'ensemble des cellules qui composent l'organe de Corti peuvent toutes être distinguées dès E18 et que leur apparition suit un gradient dont l'axe s'étend de la base vers l'apex du canal cochléaire. Ces résultats sont en accord avec les données déjà existantes, mais parcellaires, chez le rat et chez d'autres mammifères (Anniko, 1983; Lim et Anniko, 1985; Rubel, 1978; Romand *et al.*, 1993; Zine et Romand, 1996; Mu *et al.*, 1997; Sher, 1971). Ces précédentes études morphologiques ont également rapporté que les premières cellules identifiables dans l'organe de Corti en formation étaient les cellules sensorielles internes. Ces dernières sont observées dès E15 chez la souris et dès E18 chez le rat (Anniko, 1983; Romand *et al.*, 1993; Zine et Romand, 1996). D'une manière inattendue, nos observations montrent qu'au sein de la ZNPC, la première cellule qui se distingue avant E18, au niveau de la dépression entre le GER et le LER, n'est pas une cellule sensorielle.

Afin de mettre en évidence cette cellule, nous avons appliqué une méthode cytochimique : la méthode de Thiery (Thiery, 1967). Cette technique permet la mise en évidence des polysaccharides possédant des alcools vicinaux. Appliquée sur des coupes semifines et ultrafines, cette méthode nous a permis de suivre cette cellule à tous les stades observés, depuis E16 jusque E19. Sur base de ces observations, nous avons reconnu cette cellule comme étant la cellule pilier interne. Nous sommes ainsi les premiers à identifier la cellule pilier interne comme étant la première cellule de l'organe de Corti en formation pouvant être discriminée.

Nous montrons également qu'en plus du nombre de couches de noyaux visibles, le GER et le LER peuvent être distingués par une petite dépression visible à la surface de l'épithélium ainsi la présence ou l'absence de microvillosités au niveau de la face apicale des cellules. En effet, alors que l'ensemble du GER possède cette caractéristique, seules 7 à 8 rangées de cellules du LER, les plus proches du GER, présentent également des microvillosités.

Grâce à la mise en évidence de p27<sup>kip1</sup>, nous avons pu localiser la ZNPC rapport au GER et au LER. Seule une petite partie du GER est englobée dans cette zone de non-prolifération,

définissant sa limite interne. De façon surprenante, la partie externe de la ZNPC est limitée aux 7 à 8 rangées de cellules du LER qui présentent des microvillosités. Nos résultats montrent également sans ambiguïté que les cellules sensorielles internes ainsi que les cellules phalangées trouvent leur origine dans la partie de la ZNPC se situant dans le GER. Les cellules sensorielles externes, les cellules de Deiters et les cellules piliers externes sont quant à elles originaires de la ZNPC se trouvant dans le LER.

Afin de vérifier la mise en place de l'organe de Corti au sein de la ZNPC, nous avons analysé l'activation de Notch en marquant son domaine intracellulaire en immunofluorescence. Murata et ses collaborateurs (2006; 2009) ont mis en évidence une forte activation de Notch dans les cellules de Deiters en développement et plus faible au sein des cellules piliers interne et externe. Nos résultats sont en accord avec ces études excepté en ce qui concerne l'activation de Notch au sein de la cellule pilier interne. En effet, nos observations effectuées entre E16 et E19 ne montrent pas d'activation de Notch dans cette cellule, qui est la seule à briser l'alternance entre cellules sensorielles et cellules de soutien.

# Early identification of inner pillar cells during rat cochlear development

Nicolas Thelen · Ingrid Breuskin · Brigitte Malgrange · Marc Thiry

Received: 27 January 2009 / Accepted: 16 April 2009 / Published online: 15 May 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** Although the structure of the auditory organ in mature mammals, the organ of Corti, is clearly established, its development is far from being elucidated. Here, we examine its spatio-temporal development in rats from embryonic day 16 (E16) to E19 by using cytochemical and immunocytochemical methods at the light- and electron-microscope levels. We demonstrate that the organ of Corti develops from a non-proliferating cell zone that is located in the junctional region between two edges of the dorsal epithelium of the cochlear duct. We also reveal that the first

cells to develop in this zone are the inner pillar cells, a particular type of non-sensory supporting cell, which arise in the base of the cochlear duct at the boundary between the two ridges at E16. Cell differentiation in this prosensory region continues according to a base-to-apex gradient; the inner hair cells appear in the greater epithelial ridge at E17 and the outer hair cells in the lesser epithelial ridge at E18. At E19, the various cell types of the organ of Corti are in place. Finally, we show that unlike the development of all the supporting cell types of the organ of Corti, the development of inner pillar cells within the prosensory domain seems not to involve Notch1 activation. These results highlight the central role that the inner pillar cells probably play in the development of the organ of Corti.

This work received financial support from the Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (grant no. 3.4540.06). N.T. is a PhD grant holder of the F.N.R.S.; B.M. is a Senior Research Associate of the F.N.R.S.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00441-009-0810-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

N. Thelen · M. Thiry (✉)  
Cellular Biology Unit,  
Center for Cellular and Molecular Neuroscience,  
University of Liège,  
C.H.U. Sart Tilman, B36,  
4000 Liège, Belgium  
e-mail: mthiry@ulg.ac.be

N. Thelen  
e-mail: nthelen@ulg.ac.be

I. Breuskin · B. Malgrange  
Developmental Neurobiology Unit,  
Center for Cellular and Molecular Neuroscience,  
University of Liège,  
C.H.U. Sart Tilman, B36,  
4000 Liège, Belgium

I. Breuskin  
e-mail: ingrid.breuskin@student.ulg.ac.be

B. Malgrange  
e-mail: bmalgrange@ulg.ac.be

**Keywords** Organ of Corti · Pillar cell · Development · Embryo · Rat (Wistar)

## Introduction

In mammals, the perception of sound is mediated by an epithelial sensory patch located in the cochlear region of the inner ear, named the organ of Corti (OC; Kelley and Bianchi 2002; Kelley 2006a). The latter is composed of mechanosensory hair cells and non-sensory supporting cell types. The hair cells are modified epithelial cells that utilize a group of derived microvilli, referred to as stereocilia, to perceive pressure waves induced through sound. Based on their morphology and physiology, two types of hair cells can be distinguished: inner and outer hair cells. At least four types of supporting cells can be identified in the OC: inner pillar cell, outer pillar cell, inner phalangeal cell, and Deiters' cells. These cells are arranged in a regular mosaic pattern running along the length of the snail-like cochlea

from base to apex. One of the most striking aspects of this mosaic is that specific cell types are arranged in discreet rows. The edge of the OC located closest to the modiolus is composed of a single row of alternating inner hair cells and inner phalangeal cells. The OC edge located closest to the stria vascularis is composed of three rows of outer hair cells and Deiters' cells that are also arranged into a regular alternating mosaic. Finally, the single row of inner hair cells and the three rows of outer hair cells are separated by the tunnel of Corti, which is a space delimited by a single row of inner pillar cells and a single row of outer pillar cells. The formation of Corti's tunnel occurs after birth in the rat (Roth and Bruns 1992). Despite the well-known morphology of the mature OC, data on the development of this remarkable structure, particularly during the neonatal period, are still sparse.

Hair cells and supporting cells are derived from a pool of progenitors located in the dorsal wall of the cochlear duct, which is formed by a thickened epithelium (Kelley 2006a). Between E12 and E16 in mice, the cells that give rise to the OC exit the cell cycle to form a postmitotic neuroepithelial sheet suspended in the spiral duct of the cochlea (Ruben 1967). Terminal mitosis occurs in a gradient that begins in the apex of the cochlear spiral and extends toward the base. This gradient is mediated by the onset of an apical-to-basal gradient of expression of p27<sup>kip1</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) that functions as an inhibitor of cell-cycle progression (Chen and Segil 1999; Lee et al. 2006). At E14, p27<sup>kip1</sup> protein expression is only found in a small part of the dorsal epithelium. The pattern and timing of expression of p27<sup>kip1</sup> in the cochlea suggests that the gradient of cell-cycle exit has an important role in limiting progenitor number during the development of the OC (Lee et al. 2006).

On the basis of the number of cell layers, the dorsal epithelium of the cochlea can be divided into two distinct ridges of cells separated by a depression: the greater epithelial ridge (GER) and the lesser epithelial ridge (LER; von Kölliker 1879; Weibel 1957; Thom et al. 1978; Kelley and Bianchi 2002). The GER occupies approximately two thirds of the dorsal wall of the duct on the modiolar border, whereas the LER comprises the remaining third on the striolar edge. However, whether the differentiation of this dorsal epithelium takes place before or after the initiation of hair cell and supporting cell differentiation is unclear. The precise location of the non-proliferating cell zone with regard to these two parts of the dorsal epithelium has also not been clearly determined, as previously noted (Chen and Segil 1999). Finally, the question of whether the OC is derived from the cells of GER or LER or both is still debated (Pearson et al. 1973; Lim and Anniko 1985; Chen and Segil 1999). Recent studies (Brooker et al. 2006; Kiernan et al. 2006; Murata et al. 2006) have revealed that Jagged1-mediated Notch1 signaling is essential during early development for the establishment of this zone of non-proliferating cells within the cochlear

epithelium. Furthermore, Notch signaling is thought to mediate the differentiation of hair cells and supporting cells arranged in a periodic pattern via lateral inhibition (Lanford et al. 1999; Zhang et al. 2000; Brooker et al. 2006; Kiernan et al. 2006; Murata et al. 2006; Takebayashi et al. 2007). Cells destined to become hair cells express Notch ligands such as Delta1 and Jagged2. These ligands activate the Notch signaling pathway in adjacent cells, inhibiting these neighboring cells from becoming hair cells. Consequently, these cells become supporting cells instead of hair cells.

In this study, we have systematically examined the structure of the dorsal epithelium of the cochlea during the development of the OC in rat embryos from the 16th day of gestation (E16) to E19 by photonic and transmission electron microscope. Cytochemical and immunocytological markers of hair cells and supporting cells have also been employed to investigate the initial steps of their differentiation by confocal and transmission electron microscope. We show that the OC develops from the non-proliferating cell zone that is located in the junctional region between the GER and LER. During the course of development, the cells of the OC appear in this prosensory primordium according to a base-to-apex gradient. The inner pillar cells are the first detectable cells of the OC; they form at the boundary between the two ridges at E16. The inner hair cells appear in the GER at E17, whereas the outer hair cells are recognizable at E18 in the LER. At E19, the various cells of OC are in place. Finally, we show that the early differentiation of the inner pillar cells does not seem to involve the activation of Notch signaling.

## Materials and methods

### Animals and OC explants

Animal handling was carried out in compliance with the University of Liège Animal Care and Use Committee guidelines that are in accordance with the declaration of Helsinki. Wistar rats were bred in our animal facility. Timed-mated pregnant Wistar rats were killed from E16 to E19. The day of coitus was recorded as day 0 of gestation. Embryos were removed from the uterus and transferred into a glass Petri dish containing phosphate-buffered saline (PBS: 154 mM NaCl, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2). Watchmaker forceps were used to dissect the cochlea under a stereomicroscope. The OC were then isolated, free from surrounding tissues.

### Preparation of OC for examination by light and electron microscopy

The OC were fixed for 1 h at room temperature in a solution composed of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M

Sörensen's buffer (0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4). After several washes in the same buffer, the samples were sliced in three equal parts: base, middle, and apex. The fragments were then postfixed for 60 min with 2% osmium tetroxide, washed in deionized water, dehydrated through graded ethanol (70%, 95%, 100%), and embedded in Epon for 24–48 h at 60°C.

Semithin sections (1 µm thick) were obtained by means of an ultramicrotome (Reichert Ultracut E) equipped with a diamond knife. They were stained with 0.5% toluidine blue in 1% carbonate sodium and examined in a Zeiss Axioplan microscope.

For transmission electron microscopy, ultrathin sections (700 Å thick) were cut from the same blocks as those used for the preparation of semithin sections. The ultrathin sections were mounted on copper grids coated with collodion and contrasted with uranyl acetate and lead citrate for 5 min each before being examined under a Jeol CX 100 II transmission electron microscope at 60 kV.

#### Data and statistical analysis

We observed 89 organs of Corti (8 at E16, 28 at E17, 30 at E18, and 23 at E19) at three levels: basal, medial, and apical. Three to four semithin sections were cut at each level. The data from our observations were analyzed by using a two way analysis of variance (ANOVA). The Bonferroni post-test was used to compare parameters between groups when appropriate. Statistical analysis was performed by Graphpad Prism 4.00 software.

#### Immunocytochemistry

Cochleae were fixed for 30 min at room temperature in a solution composed of 2% formaldehyde in Sörensen's buffer (pH 7.4). After several washes in the same buffer, the samples were impregnated for 10 min at 37°C in 5% gelatine in Sörensen's buffer, incubated in five baths of 30% saccharose in Sörensen's buffer (20 min each), embedded in OCT compound (VWR International, Poole, England), and incubated at -70°C in an isopentane bath. Cryosections (7–10 µm thick) were obtained by means of a cryostat (Leica CM 3050 S).

For immunolabeling, cryosections were rinsed in PBS (140 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) and permeabilized for 10 min at room temperature in 1% Triton X-100 in PBS. After being washed in PBS, the sections were soaked for 30 min at 37°C in 10% normal goat or rabbit serum (NS) in PBS, immersed for 35 min at 37°C in the primary antibody containing 5% NS, washed in PBS, and immersed for 35 min at 37°C in a solution containing the secondary antibody. In some case, tetramethylrhodamine isothiocyanate conjugated to phalloi-

din (1:1000; Sigma) was added to the solution containing the secondary antibody in order to stain F-actin. Finally, the cryosections were rinsed in PBS and mounted with Citifluor AF1 (Laborimpex, Brussels, Belgium). The primary antibodies used were as follows: mouse anti-p27<sup>kip1</sup> antibody (1:100; BD Biosciences, Erembodegem, Belgium), rabbit anti-p75<sup>ngfr</sup> antibody (1:100; Chemicon International, Temecula, Calif., USA), rabbit anti-myosin VI antibody (1:75; Tama Hasson, University of California at San Diego, San Diego, Calif., USA), mouse anti-S100A1 antibody (1:100; Sigma), rabbit anti-cleaved-Notch1 antibody (1:30; cNotch, Cell Signalling Technology), goat anti-notch1 antibody (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Bergheimer, Germany), goat anti-jagged2 antibody (1:100; Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-Math1 antibody (1:50; Abcam, Cambridge, UK). The secondary antibodies used were: goat anti-mouse Alexa 488, goat anti-rabbit Alexa 594, and rabbit anti-goat Alexa 488, all from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands) and diluted 1:250. For immunolabeling with cNotch antibody, the slides were incubated for 30 min at 80°C in 0.01 mol/l citrate buffer (pH 6.8), washed in PBS, permeabilized for 10 min at room temperature in 1% Triton X-100 in PBS for 10 min, and incubated for 30 min at 37°C in 10% NS before being treated with the primary antibody. For immunolabeling with the Math1 antibody, cryosections were rinsed in a TRIS-HCl buffer (50 mM TRIS base, pH 7.4), permeabilized for 10 min at room temperature in 1% Triton X-100 in TRIS-HCl buffer, washed in PBS, soaked for 30 min at 37°C in 5% NS in TRIS-HCl, immersed overnight at 4°C in the primary antibody containing 5% NS, washed in TRIS-HCl, and immersed for 35 min at 37°C in a solution containing the secondary antibody. Control experiments were carried out by replacing the primary antibody with buffer. In some case, we used TO-PRO3 (1:5000; Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) to visualize the cell nuclei.

Slides were examined with a Biorad 1024 confocal microscope (Carl-Zeiss, Jena, Germany). Acquisitions were made by using either a ×40 or a ×63 objective. Optical sections were analyzed with Software ImageJ 1.34 S.

For immunolabeling with myosin VI antibody, a DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; Fluka, Buchs, Switzerland)-labeling method was used. The cryosections were rinsed in a saline TRIS buffer (TBS: 140 mM NaCl, 50 mM TRIS, pH 7.4) and incubated in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min to remove endogenous peroxidase activity. After being washed in TBS, the sections were permeabilized for 10 min at room temperature in 1% Triton X-100 in TBS buffer, washed again in TBS, soaked for 30 min at 37°C in 10% NS in TBS, immersed for 35 min at 37°C in the primary antibody (rabbit anti-myosin VI antibody; 1:75; Tama Hasson, University of California at San Diego)

containing 5% NS, washed in TBS, and immersed for 35 min at 37°C in a solution containing the secondary antibody (anti-rabbit biotin; 1:1200; Invitrogen, Eugene, Ore., USA). After further washes in TBS, the sections were immersed for 1 h at room temperature in a solution containing the streptavidin-peroxydase complex (1:2000; Roche, Heidelberg, Germany). The color reaction was performed with DAB substrate solution (0.02% DAB, 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50 mM TRIS-HCl, pH 7.3) for 10 min. The sections were then washed in deionized water and dehydrated through graded ethanol (70%, 95%, 100%). Some sections were cleared in xylene, mounted with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany), and examined in a Zeiss Axioplan microscope. Other sections were embedded in Epon for 24–48 h at 60°C.

Semithin sections (1 µm thick) were obtained by means of an ultramicrotome (Reichert Ultracut E) equipped with a diamond knife. They were examined in a Zeiss Axioplan microscope.

For transmission electron microscopy, sections (5000 Å thick) were cut from the same blocks as those used for the preparation of semithin sections. The sections were mounted on copper grids coated with collodion, contrasted with uranyl acetate and lead citrate for 5 min, and examined under a Jeol CX 100 II transmission electron microscope at 80 kV.

#### Detection of polysaccharides on semithin and ultrathin sections

Polysaccharides were detected according to Thiéry (1967). Semithin and ultrathin sections taken from glutaraldehyde-fixed and Epon-embedded blocks were incubated for 15 min in the dark at room temperature in 3% aqueous solution of periodic acid (Sigma, Bornem, Belgium). After being rinsed in deionized water, the sections were incubated for 24 h in 0.2% thiocarbohydrazide (Merck, Overijse, Belgium) diluted in 20% acetic acid (UCB, Leuven, Belgium), rinsed in decreasing solutions of acetic acid (10%, 5%, 2.5%), and finally in deionized water. Sections were incubated for 60 min in 1% silver proteinate (Sigma) in the dark, washed in deionized water, and air-dried. For controls, the periodic acid, thiocarbohydrazide, or silver proteinate steps were omitted.

## Results

### Morphological and ultrastructural analysis of OC development from E16 to E19 in rat

To follow the different steps of the OC formation in the cochlear canal successively, we examined semithin sections

in the base, the middle, and the apex of 89 samples taken from rat embryos from E16 to E19. Furthermore, the analyses of ultrathin sections allowed us to complete and/or to define more precisely some observations obtained on semithin sections.

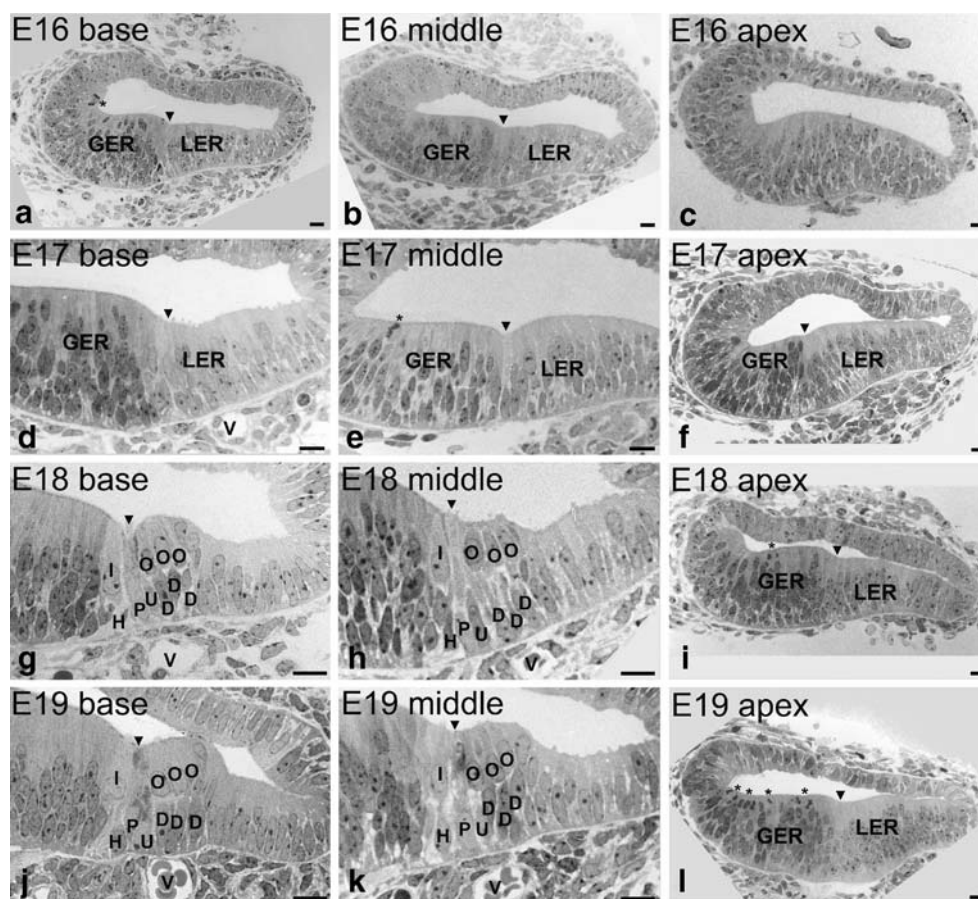
No recognizable OC was ever observed at E16 (Fig. 1a–c). In the dorsal wall of the cochlear duct, a tall columnar epithelium formed several layers of nuclei. However, in the basal and medial region of the cochlea (Fig. 1a, b), a depression separated the dorsal epithelium into two distinct parts. The region located closest to the modiolus was formed by five to six layers of nuclei, whereas the other region, situated at some distance from the modiolus, comprised three to four layers of nuclei. These two regions corresponded to GER and LER, respectively. Under the LER nearest to the GER, we identified the spiral vessel in the underlying connective tissue.

In ultrathin sections, we observed that all the cells of the dorsal epithelium came into contact with the basal membrane whatever the region concerned. On the other hand, the apical pole of cells from GER presented numerous long microvilli, whereas those of LER exhibited only a few short microvilli, except for the seven to eight cells closest to GER that were similar to the cells from the GER (Fig. 2a, b).

By E17 (Fig. 1d–f), GER and LER were obvious in the three parts of the cochlea. In the base and the middle of the cochlea, the number of layers of nuclei in both GER and LER was reduced compared with that observed at E16. At the transition between GER and LER in the middle and base of the cochlea, we sometimes also observed a cell spreading over the whole height of the epithelium and possessing a nucleus in the basal position. This observation was more frequent in the base (25 of 61 semithin sections, see Table S1 in Electronic supplementary materials) than in the middle (7 of 28 semithin sections, see Table S1 in Electronic supplementary materials; Fig. 1d, e, arrowhead). At the ultrastructural level, this cell was characterized by the presence of non-contrasted material in its cytoplasm (Fig. 3). In addition to this tall cell, we could identify a future inner hair cell on the basis of the layout of the cells and the position of their nuclei in the dorsal epithelium in a few basal region of the cochlea (Fig. 4a). This inner hair cell was located at the striolar end of the GER.

At E18 (Fig. 1g–i), the inner and outer hair cells were recognizable in most of the semithin sections from the base and middle of the cochlea. By contrast, in the apex, the OC could not be recognized, and we could only discern GER and LER (Fig. 1i). Quantitative analysis (Fig. 4a, b) revealed that, at the base, the inner hair cells and the outer hair cells could be readily seen in almost all of semithin sections examined. In the middle, the same cells were identifiable in 75 and 65 out of 99 semithin sections studied

**Fig. 1** Morphological analysis of the dorsal epithelium of the cochlear duct from E16 to E19. Semithin sections from the base (a, d, g, j), middle (b, e, h, k) and apex (c, f, i, l) of the cochlear duct at E16 (a–c), E17 (d–f), E18 (g–i), and E19 (j–l). All sections are stained with toluidine blue and oriented in the same way (*left* modiolar region, *bottom* dorsal wall of the cochlear duct). *Arrowhead* Depression of dorsal epithelium, *star* mitosis, *GER* greater epithelial ridge, *LER* lesser epithelial ridge, *I* inner hair cell, *O* outer hair cell, *H* phalangeal cell, *D* Deiters' cell, *P* inner pillar cell, *U* outer pillar cell, *V* spiral vessel. Bars 12  $\mu$ m



(see Table S1 in Electronic supplementary materials). In ultrathin sections, the apical region of hair cells was characterized by the presence of a cuticular plate under the plasma membrane and immature stereocilia (see Figure S1 in Electronic supplementary materials).

By E19 (Fig. 1j–l), the various cell types of the OC were clearly present in most of the semithin sections from the base and middle of the cochlea, whereas the OC could never be detected in the apex (Fig. 1l). Interestingly, we observed that the inner pillar cell was larger than the outer pillar cell (Fig. 5a). At the ultrastructural level, the inner pillar cells, and not the outer pillar cells, accumulated large amounts of non-contrasted material in their supranuclear region (Fig. 5b).

#### Localization of prosensory region within dorsal epithelium

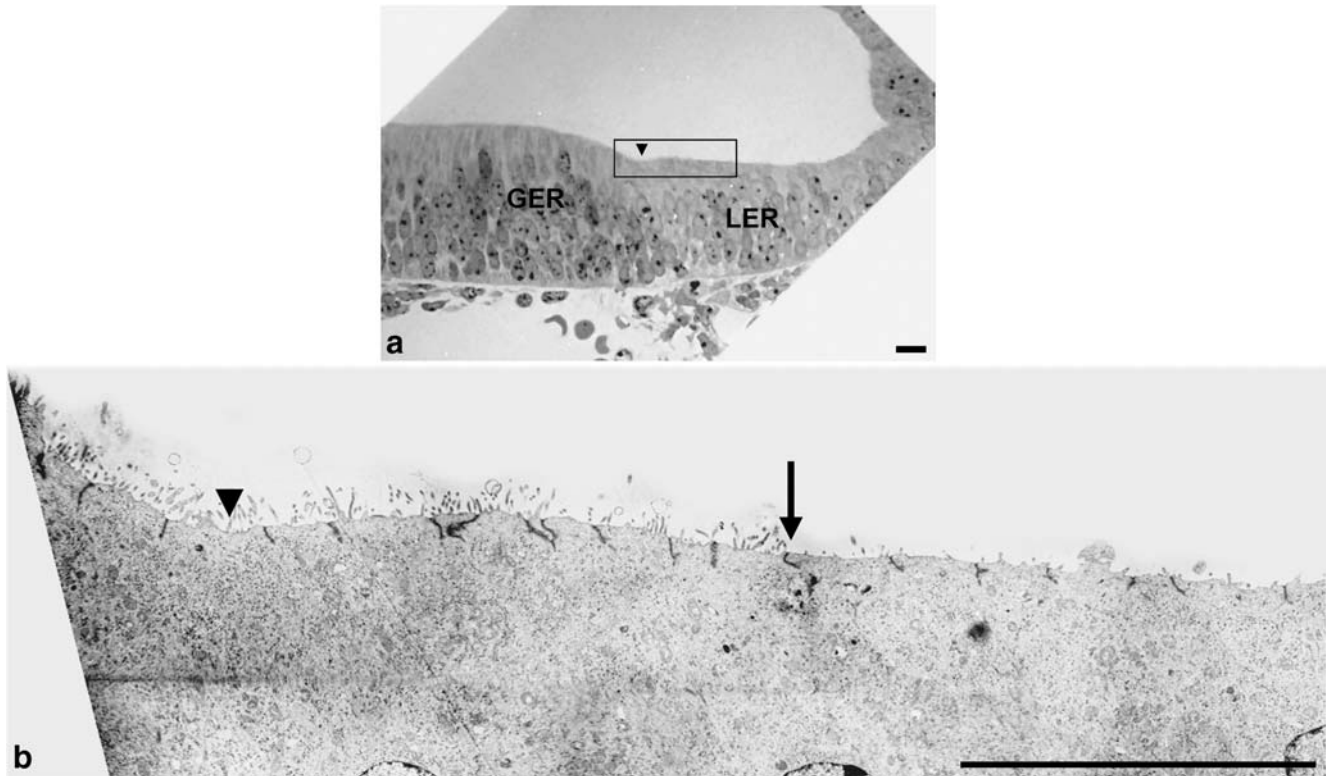
In previous studies (Chen and Segil 1999; Lee et al. 2006), the OC has been shown to develop from a band of non-proliferating cells situated in the dorsal epithelium. This cell band is specifically labeled by an antibody to p27<sup>kip1</sup>, a CKI that has been implicated in the exit of cochlear progenitors from the cell cycle.

To identify the precise location of this band in the dorsal epithelium and, in particular, in accordance with the

distinction of GER/LER, we carried out double-labeling with p27<sup>kip1</sup> and phalloidin. The latter acted as a marker for F-actin for the detection of hair cells via the presence of stereocilia. In the present study, phalloidin allowed us to detect the presence of numerous microvilli at the surface of cells from GER and of a few cells from LER closest to GER. Under these conditions (Fig. 6a–c), we were able to show that, at E16, the p27<sup>kip1</sup>-positive band contained cells from the GER/LER transitional region. More specifically, the largest part of this band comprised cells from LER closest to the depression, and the remaining part was composed of a few GER cells covered with microvilli and situated at the border in the depression. When hair cells were recognizable, p27<sup>kip1</sup> labeling was only present in supporting cells, excluding the hair cells (see Figure S2 in Electronic supplementary materials).

#### Characterization of first identifiable OC cell

To determine the nature of the first identifiable cell of the OC, we carried out immunolabeling of cryosections from 46 cochleae from E16 to E19 by using various markers for the different cell types. As hair cells are reported to be the first identifiable differentiated cell types in the cochlear prosensory region (Kikuchi and Hilding 1965; Anniko



**Fig. 2** Morphological differences within the dorsal epithelium of the cochlear duct at E16. **a** Semithin section from the base of the cochlear duct at E16 (*GER* greater epithelial ridge, *LER* lesser epithelial ridge); toluidine blue staining. **b** Apical detail of a serial section from the

boxed area in **a** at the ultrastructural level (*arrowhead* depression of dorsal epithelium, *arrow* transition between zone with numerous microvilli and zone with few microvilli). Bars 12  $\mu$ m

1983), we used antibodies to myosin VI and to Math1, two of the earliest definitive markers of developing hair cells (Hasson and Mooseker 1997; Montcouquiol and Kelley 2003; Woods et al. 2004; Kelley 2006a). Under these conditions, no labeling was observed before E18, even at the ultrastructural level (Fig. 7a–d; see also Figure S4, Figure S5 in Electronic supplementary materials). At this embryonic stage, positive labeling could be found in hair cells in the base and middle of most examined cochleae, first in the inner hair cells and subsequently in the outer hair cells (Fig. 7a–d, see also Figure S4, Figure S5 in Electronic supplementary materials). However, the first identifiable cell of the OC was never positive for myosin VI or for Math1.

The cytoplasm of the first identifiable cell observed on ultrathin sections contained material similar to that observed in the inner pillar cells at E19 ((Malgrange et al. 2002); present study) suggesting that this first identifiable cell was a pillar cell. To test this hypothesis, we first used an antibody to p75<sup>ngfr</sup>, a marker specific for pillar cells (Von Bartheld et al. 1991; Gestwa et al. 1999; Sano et al. 2001; Mueller et al. 2002; Woods et al. 2004). Positive p75<sup>ngfr</sup> labeling was observed in the first identifiable cell of the OC (Fig. 7e, f). However, the p75<sup>ngfr</sup> labeling occurred

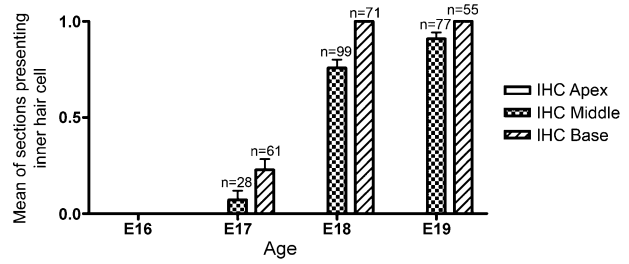
from E17 in a relatively broad band of cells on the base of the cochleae (data not shown; Mueller et al. 2002) and became restricted to the future inner pillar cells only from E18 in the base and middle of the cochleae (Fig. 7e, f). When using an antibody to S100A1, a marker specific for inner hair cells, inner phalangeal cells, and Deiters' cells (Coppens et al. 2001; Woods et al. 2004), no signal was found in the first identifiable cell of the OC (see Figure S3 in Electronic supplementary materials).

As pointed out in several studies (Hilding et al. 1977; Lim and Rueda 1990; Kawamata and Igarashi 1993; Prieto et al. 1995; Bianchi et al. 1999; Rueda et al. 2003), pillar cells accumulate large amounts of polysaccharides. We therefore decided, subsequently, to apply the periodic acid-thiocarbohydrazide-silver proteinate method (Thiery 1967), a cytochemical technique known to detect polysaccharides in biological material. On semithin sections (Fig. 8a), we observed a black precipitate on the first identifiable cell from E17 in the base and middle of the cochleae. The intensity of the silver deposit progressively increased until

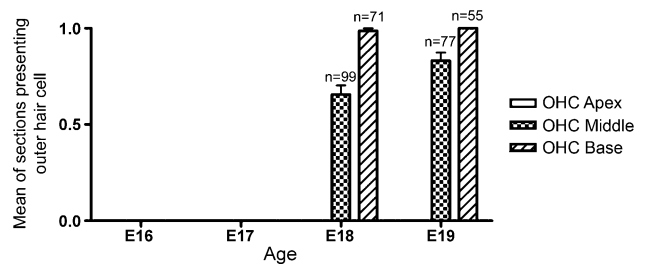
**Fig. 3** Ultrastructural morphology of the cell located at the transition between GER and LER at E17 (*arrowhead* depression of dorsal epithelium, *dashed arrow* non-contrasted material). Bar 2  $\mu$ m



**a** Inner hair cell identification in cochlear duct from E16 to E19



**b** Outer hair cell identification in cochlear duct from E16 to E19



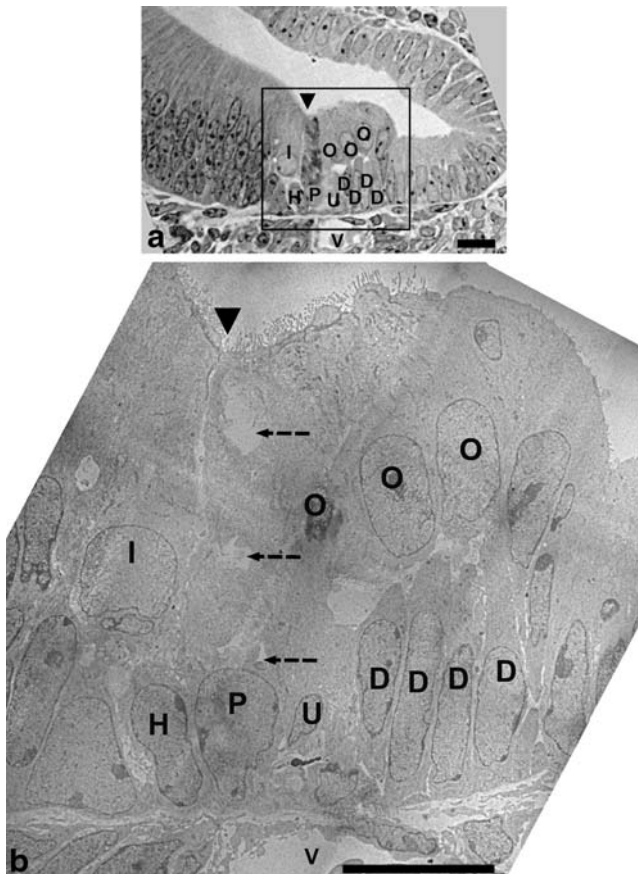
**Fig. 4** Hair cell identification in cochlear duct from E16 to E19. Quantitative analysis of sections exhibiting obvious inner hair cells (**a**) and outer hair cells (**b**) at the base, middle, and apex of the dorsal epithelium from rat cochlea from E16 to E19. To compare parameters between groups when appropriate, the Bonferroni post-test ( $P < 0.05$ ) was used after a two-way ANOVA. Statistical significance is observed in all groups between E17 and E19 (n number of semithin sections examined). Results are means  $\pm$  SEM (see also Table S1 and Statistical analysis in Electronic supplementary materials)

E19 (Fig. 8b). At this developmental stage, the inner pillar cells were strongly labeled by this method. In addition, on ultrathin sections, we showed that silver grains were present as early as E16 in a cell that was exactly located in the depression of the dorsal epithelium, i.e., at the location of the first identifiable cell in the OC (Fig. 9).

Notch signaling is not activated in inner pillar cells

The sensory patch in the cochlear epithelium is a mosaic of hair cells and supporting cells. Notch signaling is thought to govern this pattern of differentiation through lateral inhibition (Lanford et al. 1999; Brooker et al. 2006).

To examine whether Notch signaling is involved in the early differentiation of pillar cells, we performed immunolabeling analysis with an anti-notch1 antibody and an anti-jagged2 antibody. At E19, jagged2 was expressed in all hair cells and notch1 in all supporting cells (see Figure S5 in Electronic supplementary materials). These results were consistent with those previously reported (Kelley 2006a; Lanford et al. 1999). However, with anti-cNotch, an antibody specifically recognizing the intracellular domain of Notch1 cleaved by presenilin/ $\gamma$ -secretase activity (Tokunaga et al. 2004; Murata et al. 2006), activated Notch1 clearly started to be expressed in all the supporting



**Fig. 5** General view of Corti's organ at E19. **a** Semithin section from the base of the cochlear duct at E19; toluidine blue staining. **b** Ultrastructural view of a serial section of the boxed area in **a**. Note that the sections pass through four nuclei of Deiters' cells, but there is no extra row of Deiters' cells (arrowheads depression of dorsal epithelium, dashed arrows non-contrasted material, *I* inner hair cell, *O* outer hair cell, *H* phalangeal cell, *D* Deiters' cell, *P* inner pillar cell, *U* outer pillar cell, *V* spiral vessel). Bars 16  $\mu$ m

cells of the developing OC at E19, except for the inner pillar cells (Fig. 10a–d). Identical results were obtained at E18 (data not shown).

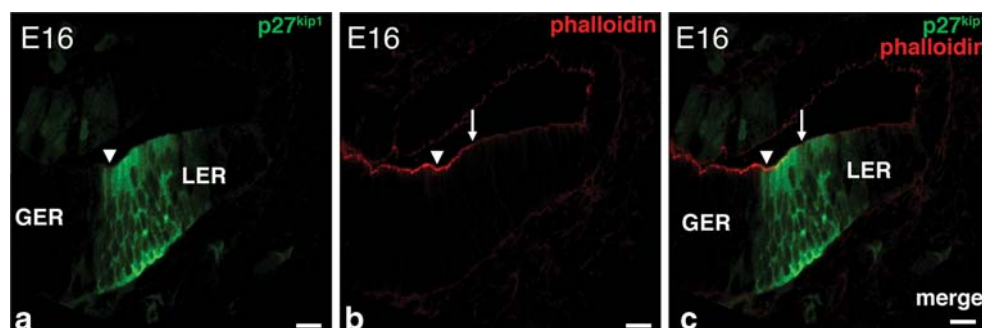
## Discussion

The present study has focused on the development of the OC from E16 to E19 in the rat. During this short period of time, we show that the OC forms within the dorsal epithelium of the cochlear duct. Our results highlight several early steps in the development of the OC.

### GER/LER discrimination within dorsal epithelium precedes OC identification

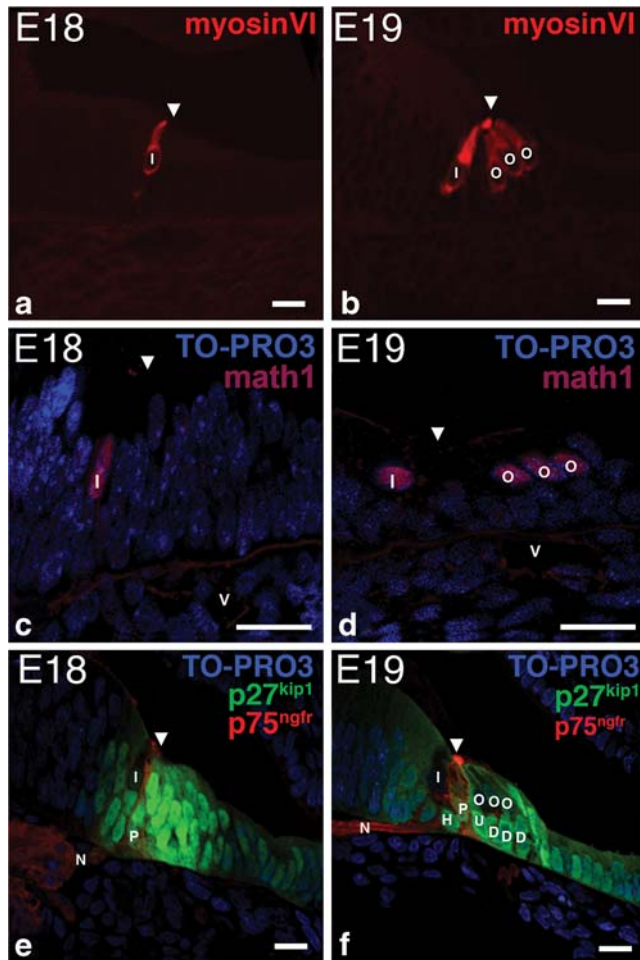
Based on their position within the epithelium, we demonstrate that, in rat, the various cell types of the OC become identifiable in most preparations by E18. This observation is in agreement with previous studies of the rat (Romand et al. 1993; Zine and Romand 1996; Mu et al. 1997). We also note that the OC is no longer identifiable in the apical region of the cochlea at E19. As previously reported in rat (Mu et al. 1997) and in mice (Sher 1971; Anniko 1983; Lim and Anniko 1985), the differentiation of the OC in the apical segment of the cochlea occurs later during morphogenesis. This result is consistent with the finding that the development of the OC progresses in a wave that extends along the basal-to-apical axis of the cochlea (Rubel 1978).

On the other hand, our histological results reveal that, before the appearance of the OC, the dorsal epithelium of the cochlear duct differentiates into two distinct regions separated by a depression: the GER closest to the modiolus and the LER closest to the stria vascularis (Fig. 11). In addition to a larger number of nucleus strata, the GER can be distinguished from the LER by the presence of well-developed microvilli on the apical surface of its cells.



**Fig. 6** Immunolabeling of the dorsal epithelium of the cochlear duct at E16. **a**, **b** Localization of the prosensory region within the dorsal epithelium at E16 by using p27<sup>kip1</sup> (**a**, green) and phalloidin (**b**, red). **c** Merged image (arrowhead depression of dorsal epithelium, arrow

transition between zone with numerous microvilli and zone with few microvilli, GER greater epithelial ridge, LER lesser epithelial ridge). Bars 16  $\mu$ m



**Fig. 7** Immunolabeling of the dorsal epithelium of the cochlear duct from E18 to E19. **a–d** Localization of hair cells by using myosinVI (**a, b**, red) or Math1 (**c, d**, purple) from E18 (**a, c**) to E19 (**b, d**). **e, f** Localization of pillar cells by using p75<sup>ngfr</sup> (red) at E18 (**e**) and E19 (**f**). p27<sup>kip1</sup> localizes the prosensory region (**e**) and the supporting cells (**f**). Nuclei are stained with TO-PRO3 (**c–f**, blue). Arrowheads Depression of dorsal epithelium, *I* inner hair cell, *O* outer hair cell, *H* phalangeal cell, *D* Deiters' cell, *P* inner pillar cell, *U* outer pillar cell, *N* extensions of the spiral ganglia. Bars 16  $\mu$ m

Interestingly, we show further that the seven to eight cells of the LER closest to the GER present the same differentiation of their apical surface as those of the GER.

#### Prosensory domain straddles the GER and LER

The OC has previously been shown to develop from a population of non-proliferative cells within the dorsal epithelium (Kelley 2006b, 2007). The CKI p27<sup>kip1</sup> has also been identified as a major factor in the exit of cochlear progenitor cells from the cell cycle (Chen and Segil 1999; Lowenheim et al. 1999; Lee et al. 2006). Using p27<sup>kip1</sup> as molecular marker for the progenitor cells and phalloidin as a marker for microvilli, we have revealed that the

prosensory domain lies in the transitional region between the GER and LER (Fig. 11). More specifically, the region that will give rise to the OC, the prosensory domain, encompasses the outermost GER cells and the few LER cells presenting well-developed microvilli.

Inner hair cells derive from cells within the GER, whereas outer hair cells derive from cells within the LER

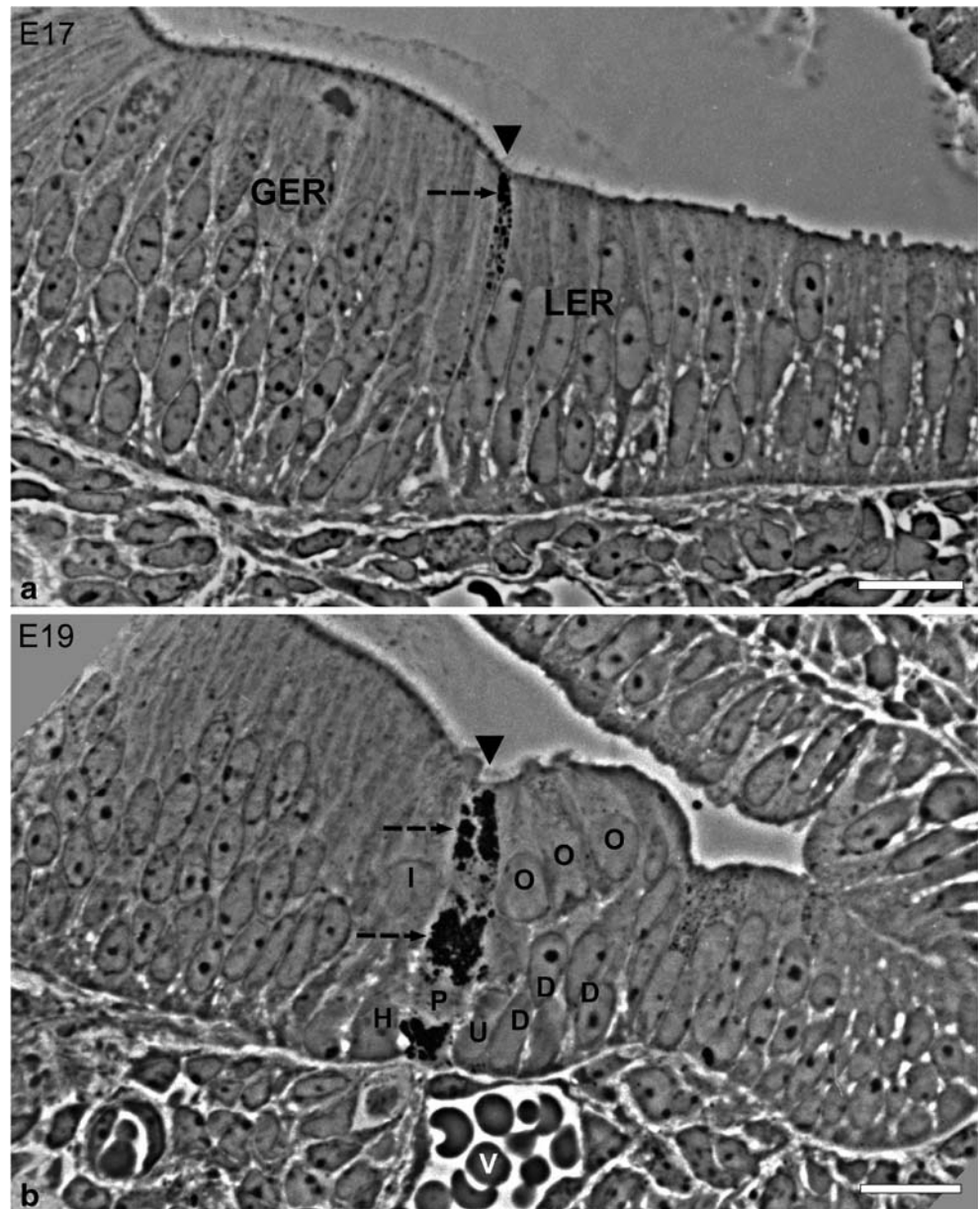
Our histological results and our immunofluorescence labeling obtained using myosin VI and Math1, two of the earliest markers for hair cells (Montcouquiol and Kelley 2003; Woods et al. 2004), clearly indicate that hair cells are identifiable from E18 at the base and middle of rat cochleae, even if, in a few rare preparations, some hair cells can be observed as early as E17 at the base (Fig. 11). In developing hair cells at E18, we have confirmed, at the ultrastructural level, the presence of a cuticular plate under the plasma membrane in their apical region. We have also demonstrated that hair cells appear in two gradients. First, a basal-to-apical gradient is evident. Hair cell development in the basal region of the cochlea precedes that in the medial region. A second gradient progresses in a wave that extends along the modiolar-to-striolar axis with inner hair cells differentiating prior to the first row of outer hair cells, and the first row of outer hair cells differentiating prior to the second row outer hair cells, and so forth. These gradients are consistent with those previously reported in morphological and molecular studies (Sher 1971; Rubel 1978; Igarashi and Ishii 1980; Anniko 1983; Sobin and Anniko 1984; Pirvola et al. 1991; Romand et al. 1993; Mu et al. 1997; Chen and Segil 1999).

However, both inner and outer hair cells have previously been suggested to derive from either the LER (Pearson et al. 1973) or the GER (Chen and Segil 1999) or the GER and LER (Lim and Anniko 1985). The present results clearly show that the inner hair cells develop in the inner part of the prosensory domain, namely in the GER part of the prosensory domain, whereas the outer hair cells develop in the LER part of the prosensory domain. As represented in the Fig. 11, the OC thus seems to develop from progenitor cells within both the GER and LER. The progenitor cells within the GER develop into the inner hair cells and probably inner phalangeal cells, whereas the progenitor cells within the LER develop into the outer hair cells and probably Deiters' and outer pillar cells.

Inner pillar cells are identified in prosensory domain before hair cells

Previous morphological studies have reported that the first cells to develop characteristics consistent with a specific cellular phenotype are the inner hair cells. This occurs

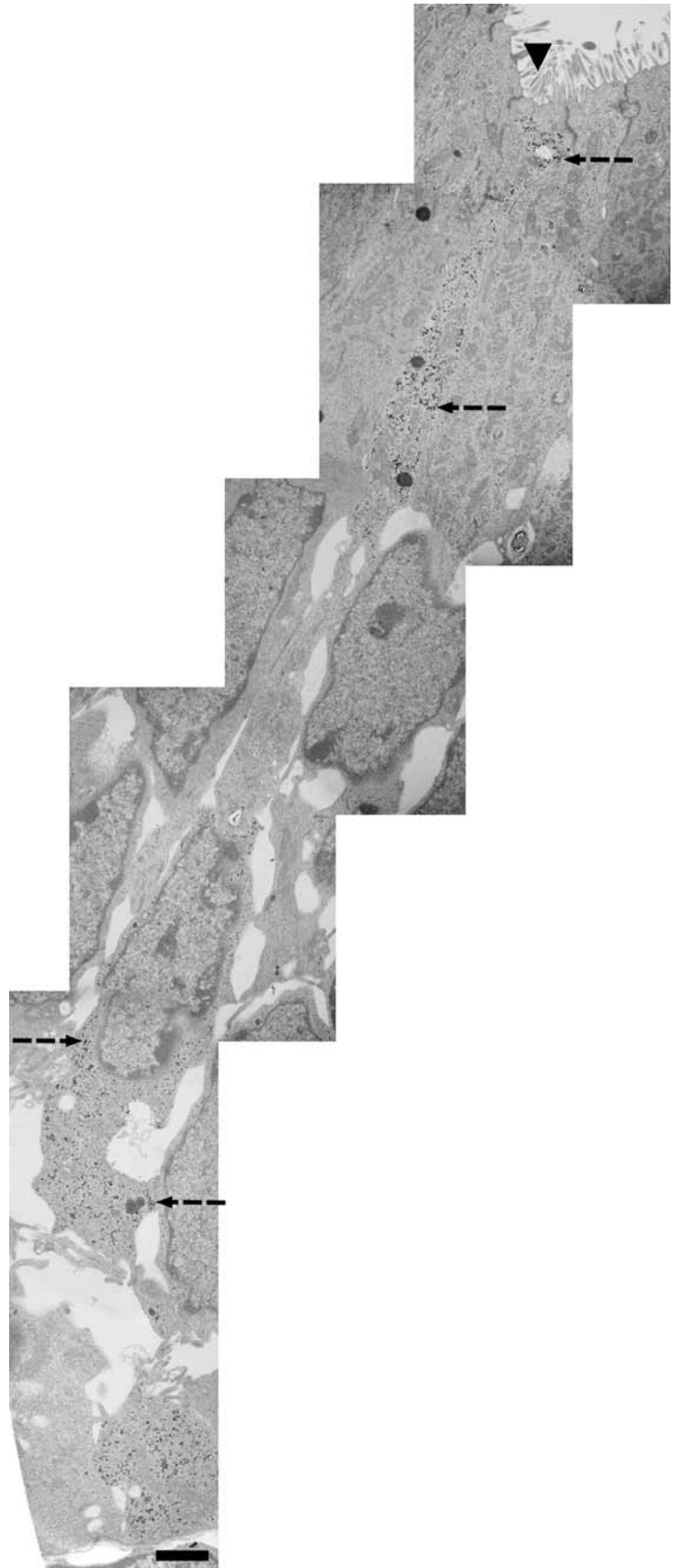
**Fig. 8** Characterization of the first identifiable cell of Corti's organ. Semithin section from the base of the cochlear duct at E17 (a) and E19 (b); polysaccharide detection with the periodic acid-thiocarbohydrazide-silver proteinate method (arrowheads depression of dorsal epithelium, dashed arrows silver precipitates, GER greater epithelial ridge, LER lesser epithelial ridge, I inner hair cell, O outer hair cell, H phalangeal cell, D Deiters' cell, P inner pillar cell, U outer pillar cell, V spiral vessel). Bars 16  $\mu$ m

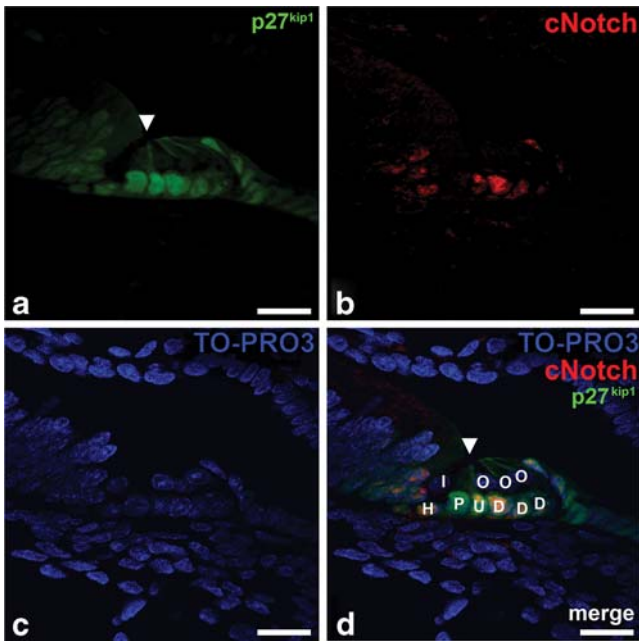


around E15 in mouse, as observed by transmission electron microscopy (Anniko 1983), and at E18 in rat, as revealed by using phalloidin staining or scanning electron microscopy (Romand et al. 1993; Zine and Romand 1996). Surprisingly, in the present study, we show that the first identifiable cells within the prosensory domain are not hair cells but rather inner pillar cells (Fig. 11). They always appear at the boundary between the GER and LER. Based on their position within the epithelium, we can identify them in semithin sections at E17. By electron microscopy, we can even identify them at E16 because of their cytoplasmic accumulation of polysaccharides. Thus, in rat, the inner pillar cells are identifiable at least one day before the hair cells. In the OC in mice,  $p75^{\text{ngfr}}$  is initially expressed in a band of progenitor cells from E15 and

becomes restricted to the inner pillar cells around E17 (Mueller et al. 2002; Woods et al. 2004). In this work,  $p75^{\text{ngfr}}$ -positive cells are only found in the cochlear epithelium from E18. Taken together, we are tempted to speculate that this discrepancy results from differences in the developmental timing between species. However, the difference observed from the previous morphological data might stem at least from the better resolution obtained when semithin sections of glutaraldehyde-fixed and Epon-embedded cochlea are used and/or from the choice of marker for the pillar cells. Indeed, the presence of polysaccharides in the pillar cells has been repeatedly reported in various mammalian species (Hilding et al. 1977; Lim and Rueda 1990; Kawamata and Igarashi 1993; Prieto et al. 1995; Bianchi et al. 1999). In rat, such sugars have been detected preferentially in pillar cells from E18 to

**Fig. 9** Ultrastructural characterization of the first identifiable cell of Corti's organ at E16; polysaccharide detection with the periodic acid-thiocarbohydrazide-silver proteinate method (*arrowhead* depression of dorsal epithelium, *dashed arrow* silver precipitates). *Bar* 2  $\mu$ m





**Fig. 10** Notch signaling is not activated in the inner pillar cells. **a–c** Immunolabeling of Corti's organ at E19 using p27<sup>kip1</sup> (**a**, green) and cNotch (**b**, red). Nuclei are stained with TO-PRO3 (**c**, blue). **d** Merged image showing cNotch and p27<sup>kip1</sup> co-localization in yellow (arrowhead depression of dorsal epithelium, *I* inner hair cell, *O* outer hair cell, *H* phalangeal cell, *D* Deiters' cell, *P* inner pillar cell, *U* outer pillar cell). Bars 16 μm

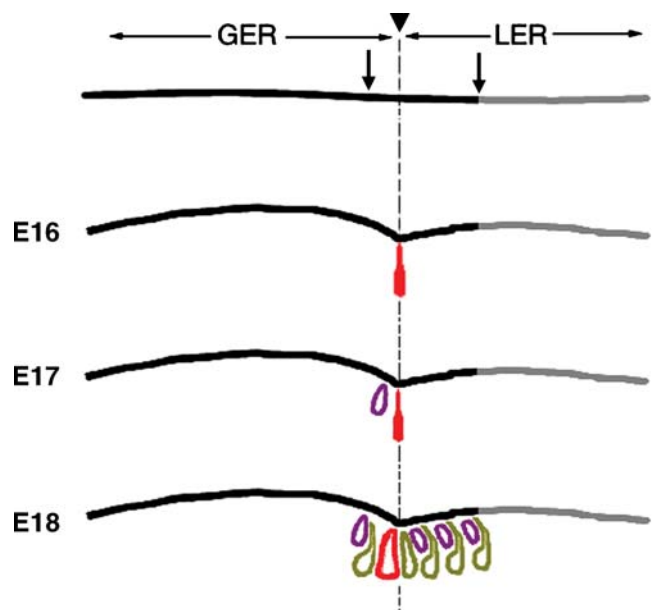
postnatal day 8 (Hilding et al. 1977; Prieto et al. 1995). We show here, for the first time, that the inner pillar cells begin to accumulate polysaccharides from E16. Further experiments are now required to define the nature of these polysaccharides and to determine their role in the development of the inner ear.

Interestingly, we can only identify the inner pillar cells after the differentiation of the dorsal epithelium into the two distinct ridges, i.e., GER and LER. However, we do not exclude the possibility that the development of inner pillar cells could play a role in the development of the depression that separates the GER and LER.

Does early commitment of inner pillar cells involve Notch signaling?

Our results indicate that the inner pillar cells develop before the hair cells. Notch signaling is generally assumed to mediate the differentiation of hair cells and supporting cells within the prosensory patch via lateral inhibition (Lanford et al. 1999; Zhang et al. 2000; Kiernan et al. 2005; Brooker et al. 2006; Murata et al. 2006). The development of supporting cells is also dependent on inductive signals generated by hair cells (Woods et al. 2004). However, morphologically, the only site within the OC in which supporting cells do not alternate with hair cells is the transitional region between the inner and outer hair cells;

this includes the inner phalangeal cell and the two pillar cells. Moreover, our results indicate that, even if Notch1 and its Jagged2 ligand are present, Notch1 signaling is not activated in the inner pillar cells when the OC develops. An activation of Notch1 signaling is detected in all the other supporting cells. This result is consistent not only with the finding that pillar cell numbers are neither decreased nor increased in any of Notch mutants studied until now (Lanford et al. 1999; Zhang et al. 2000; Kiernan et al. 2005; Brooker et al. 2006; Murata et al. 2006), but also with a recent study (Doetzlhofer et al. 2009) suggesting that pillar cell identity is maintained by the expression of the basic helix-loop-helix transcription factor, Hey2, whose expression does not require Notch signaling. Likewise, in the mouse cochlea at E18, the gene *Lfng*, which encodes an extracellular modulator of the Notch signaling pathway, appears to be expressed in all the supporting cells of the OC, except for the inner pillar cells (Zhang et al. 2000). The removal of an inner hair cell from embryonic mouse organs of Corti, even at time points as early as E16, does not change the surrounding cells, i.e., inner pillar cell or inner phalangeal cell, from a supporting cell to a hair cell fate (Kelley et al. 1995). Together, these data lead to the



**Fig. 11** Representation of OC development at the base of cochlear duct. Prior to the differentiation of Corti's organ, a prosensory domain (between the arrows) is determined in the dorsal epithelium of the cochlear duct. The latter is defined by the presence of p27<sup>kip1</sup> and numerous microvilli (black line). In addition, it straddles the GER and LER. At E16, the inner pillar cell (red), the first identifiable cell of Corti's organ, appears at the transition between the GER and LER. At E17, the inner hair cell (purple) starts its differentiation, and at E18, all the cells of Corti's organ are recognizable. Note that all the supporting cells (brown) are labeled with cNotch except for the inner pillar cell (gray line epithelium with few microvilli)

suggestion that inner pillar cells have unique stem-cell-like properties in the developing OC.

Our results imply that inner pillar cells might be committed early in the cochlea. However, the molecular factors that play a role in pillar cell development are, in large part, unknown. One signaling pathway that has been implicated in pillar cell development is the fibroblast growth factor (FGF) signaling pathway. Deletion of *Sprouty2*, a negative regulator of FGF signaling, results in an overproduction of pillar cells (Shim et al. 2005). Furthermore, deletion or inhibition of signaling by *FGFR3*, one of four tyrosine-kinase receptors, leads to the inhibition of the differentiation of the pillar cells (Colvin et al. 1996; Mueller et al. 2002; Shim et al. 2005; Hayashi et al. 2007). Puligilla et al. (2007) have reported the absence of inner pillar cells in *FGFR3<sup>-/-</sup>* mice and a significant disruption in the differentiation of outer pillar cells, outer hair cells, and Deiters' cells. Finally, Doetzlhofer et al. (2009) have recently shown that pillar cells are distinguishable from other cell types of the OC by *Hey2* expression, which is Notch-independent but is activated by the FGF signaling pathway. Taken together, these and our results support the view that inner pillar cells play a central role in OC development. However, at present, we know little about the downstream molecular events that regulate FGF signaling in cochlea. Other experiments are now required to unravel the mechanisms that control the cell fate of pillar cells, especially inner pillar cells, in this tissue.

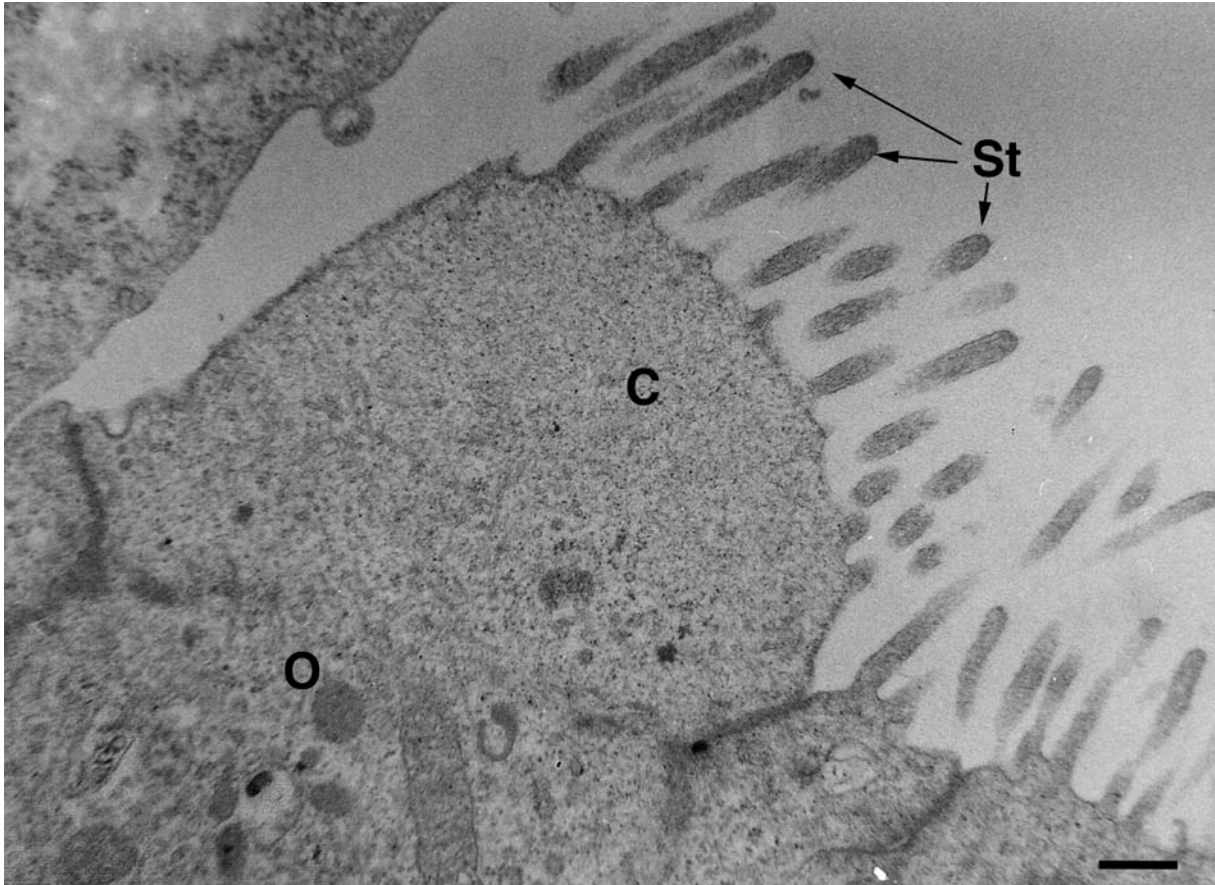
**Acknowledgements** We thank Miss F. Skivé and Mrs P. Ernst for their skilful technical assistance.

## References

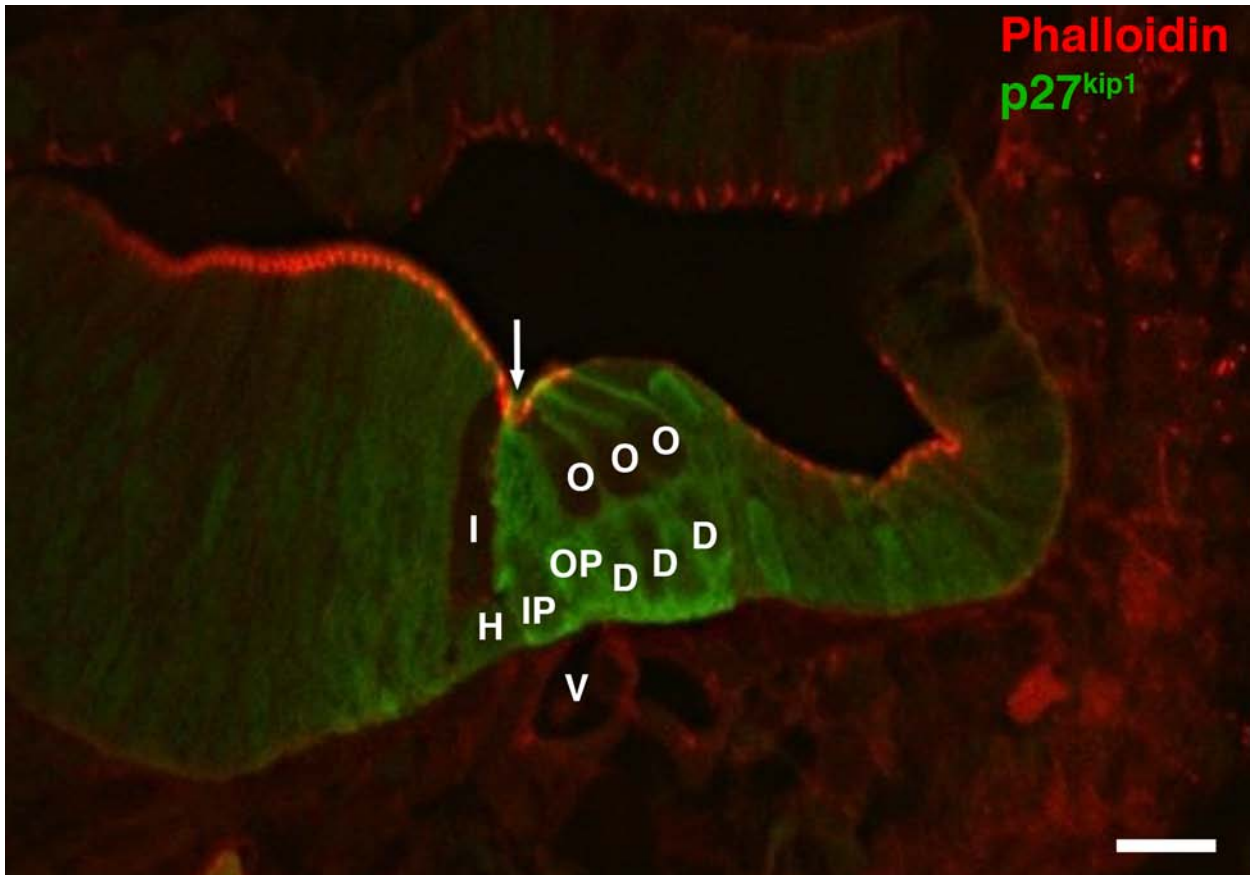
- Anniko M (1983) Cytodifferentiation of cochlear hair cells. *Am J Otolaryngol* 4:375–388
- Bianchi LM, Liu H, Krug EL, Capehart AA (1999) Selective and transient expression of a native chondroitin sulfate epitope in Deiters' cells, pillar cells, and the developing tectorial membrane. *Anat Rec* 256:64–71
- Brooker R, Hozumi K, Lewis J (2006) Notch ligands with contrasting functions: *Jagged1* and *Delta1* in the mouse inner ear. *Development* 133:1277–1286
- Chen P, Segil N (1999) *p27<sup>Kip1</sup>* links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Development* 126:1581–1590
- Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM (1996) Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 12:390–397
- Coppens AG, Kiss R, Heizmann CW, Schafer BW, Poncelet L (2001) Immunolocalization of the calcium binding S100A1, S100A5 and S100A6 proteins in the dog cochlea during postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res* 126:191–199
- Doetzlhofer A, Basch ML, Ohyama T, Gessler M, Groves AK, Segil N (2009) *Hey2* regulation by FGF provides a Notch-independent mechanism for maintaining pillar cell fate in the organ of Corti. *Dev Cell* 16:58–69
- Gestwa G, Wiechers B, Zimmermann U, Praetorius M, Rohbock K, Kopschall I, Zenner HP, Knipper M (1999) Differential expression of *trkB.T1* and *trkB.T2*, truncated *trkC*, and *p75(NGFR)* in the cochlea prior to hearing function. *J Comp Neurol* 414:33–49
- Hasson T, Mooseker MS (1997) The growing family of myosin motors and their role in neurons and sensory cells. *Curr Opin Neurobiol* 7:615–623
- Hayashi T, Cunningham D, Bermingham-McDonogh O (2007) Loss of *Fgfr3* leads to excess hair cell development in the mouse organ of Corti. *Dev Dyn* 236:525–533
- Hilding DA, Bahia I, Ginzberg RD (1977) Glycogen in the cochlea during development. *Acta Otolaryngol* 84:12–23
- Igarashi Y, Ishii T (1980) Embryonic development of the human organ of Corti: electron microscopic study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2:51–62
- Kawamata S, Igarashi Y (1993) Glycoconjugates in the cochlea as revealed by the silver methenamine method. *Hear Res* 67:75–82
- Kelley MW (2006a) Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nat Rev Neurosci* 7:837–849
- Kelley MW (2006b) Hair cell development: commitment through differentiation. *Brain Res* 1091:172–185
- Kelley MW (2007) Cellular commitment differentiation in the organ of Corti. *Int J Dev Biol* 51:571–583
- Kelley MW, Bianchi LM (2002) Development and innervation of the organ of Corti. In: Willott JF (ed) *Handbook of mouse auditory research, from behaviour to molecular biology*. CRC, Boca Raton, pp 137–157
- Kelley MW, Talreja DR, Corwin JT (1995) Replacement of hair cells after laser microbeam irradiation in cultured organs of Corti from embryonic and neonatal mice. *J Neurosci* 15:3013–3026
- Kiernan AE, Cordes R, Kopan R, Gossler A, Gridley T (2005) The Notch ligands *DLL1* and *JAG2* act synergistically to regulate hair cell development in the mammalian inner ear. *Development* 132:4353–4362
- Kiernan AE, Xu J, Gridley T (2006) The Notch ligand *JAG1* is required for sensory progenitor development in the mammalian inner ear. *PLoS Genet* 2:e4
- Kikuchi K, Hilding D (1965) The development of the organ of Corti in the mouse. *Acta Otolaryngol* 60:207–322
- Lanford PJ, Lan Y, Jiang R, Lindsell C, Weinmaster G, Gridley T, Kelley MW (1999) Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nat Genet* 21:289–292
- Lee YS, Liu F, Segil N (2006) A morphogenetic wave of *p27<sup>Kip1</sup>* transcription directs cell cycle exit during organ of Corti development. *Development* 133:2817–2826
- Lim DJ, Anniko M (1985) Developmental morphology of the mouse inner ear. A scanning electron microscopic observation. *Acta Otolaryngol Suppl* 422:1–69
- Lim DJ, Rueda J (1990) Distribution of glycoconjugates during cochlea development. A histochemical study. *Acta Otolaryngol* 110:224–233
- Lowenheim H, Furness DN, Kil J, Zinn C, Gultig K, Fero ML, Frost D, Gummer AW, Roberts JM, Rubel EW, Hackney CM, Zenner HP (1999) Gene disruption of *p27(Kip1)* allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of Corti. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4084–4088
- Malgrange B, Thiry M, Van De Water TR, Nguyen L, Moonen G, Lefebvre PP (2002) Epithelial supporting cells can differentiate into outer hair cells and Deiters' cells in the cultured organ of Corti. *Cell Mol Life Sci* 59:1744–1757
- Montcouquiol M, Kelley MW (2003) Planar and vertical signals control cellular differentiation and patterning in the mammalian cochlea. *J Neurosci* 23:9469–9478
- Mu MY, Chardin S, Avan P, Romand R (1997) Ontogenesis of rat cochlea. A quantitative study of the organ of Corti. *Brain Res Dev Brain Res* 99:29–37

- Mueller KL, Jacques BE, Kelley MW (2002) Fibroblast growth factor signaling regulates pillar cell development in the organ of corti. *J Neurosci* 22:9368–9377
- Murata J, Tokunaga A, Okano H, Kubo T (2006) Mapping of notch activation during cochlear development in mice: implications for determination of prosensory domain and cell fate diversification. *J Comp Neurol* 497:502–518
- Pearson A, Jacobson A, Van Calcar R, Sauter R (1973) The development of the ear. American Academy for Ophthalmology and Oto-laryngology, Rochester
- Pirvola U, Lehtonen E, Ylikoski J (1991) Spatiotemporal development of cochlear innervation and hair cell differentiation in the rat. *Hear Res* 52:345–355
- Prieto JJ, Beneyto M, Riquelme R, Rueda J (1995) Ultrastructural detection of glycogen in the supporting cells of the organ of Corti with the periodic acid-thiocarbohydrazide-silver proteinate method. *J Hirnforsch* 36:67–75
- Puligilla C, Feng F, Ishikawa K, Bertuzzi S, Dabdoub A, Griffith AJ, Fritzsche B, Kelley MW (2007) Disruption of fibroblast growth factor receptor 3 signaling results in defects in cellular differentiation, neuronal patterning, and hearing impairment. *Dev Dyn* 236:1905–1917
- Romand R, Zine AE, Hafidi A (1993) Ontogenesis of F-actin in hair cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 25:213–222
- Roth B, Bruns V (1992) Postnatal development of the rat organ of Corti. I. General morphology, basilar membrane, tectorial membrane and border cells. *Anat Embryol (Berl)* 185:559–869
- Rubel EW (1978) Ontogeny of structure and function in the vertebrate auditory system. In: Jacobsen M (ed) *Handbook of sensory physiology, vol 2. Development of sensory systems*. Springer, New York, pp 135–237
- Ruben RJ (1967) Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitosis. *Acta Otolaryngol* 220:1–44
- Rueda J, Cantos R, Lim DJ (2003) Distribution of glycoconjugates during cochlea development in mice: light microscopic lectin study. *Anat Rec* 274:923–933
- Sano H, Mukai J, Monoo K, Close LG, Sato TA (2001) Expression of p75NTR and its associated protein NADE in the rat cochlea. *Laryngoscope* 111:535–538
- Sher AE (1971) The embryonic and postnatal development of the inner ear of the mouse. *Acta Otolaryngol Suppl* 285:1–77
- Shim K, Minowada G, Coling DE, Martin GR (2005) Sprouty2, a mouse deafness gene, regulates cell fate decisions in the auditory sensory epithelium by antagonizing FGF signaling. *Dev Cell* 8:553–564
- Sobin A, Anniko M (1984) Early development of cochlear hair cell stereociliary surface morphology. *Arch Otorhinolaryngol* 241:55–64
- Takebayashi S, Yamamoto N, Yabe D, Fukuda H, Kojima K, Ito J, Honjo T (2007) Multiple roles of Notch signaling in cochlear development. *Dev Biol* 307:165–178
- Thiery JP (1967) Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J Microsc* 6:987–1018
- Thom L, Arnold W, Schinko I, Wetzstein R (1978) Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen des großen Epithelwulstes und seiner Beziehungen zu der sich entwickelnden Membrana tectoria im Ductus cochlearis von Meerschweinchen-feten. *Arch Otorhinolaryngol* 221:123–133
- Tokunaga A, Kohyama J, Yoshida T, Nakao K, Sawamoto K, Okano H (2004) Mapping spatio-temporal activation of Notch signaling during neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse brain. *J Neurochem* 90:142–154
- Von Bartheld CS, Patterson SL, Heuer JG, Wheeler EF, Bothwell M, Rubel EW (1991) Expression of nerve growth factor (NGF) receptors in the developing inner ear of chick and rat. *Development* 113:455–470
- Von Kölliker RA (1879) *Entwicklungsgeschichte des Menschen und der höheren Thiere*. Engelmann, Leipzig
- Weibel ER (1957) Zur Kenntnis der Differenzierungsvorgänge im Epithel des Ductus cochlearis. *Acta Anat (Basel)* 29:53–90
- Woods C, Montcouquiol M, Kelley MW (2004) Math1 regulates development of the sensory epithelium in the mammalian cochlea. *Nat Neurosci* 7:1310–1318
- Zhang N, Martin GV, Kelley MW, Gridley T (2000) A mutation in the Lunatic fringe gene suppresses the effects of a Jagged2 mutation on inner hair cell development in the cochlea. *Curr Biol* 10:659–662
- Zine A, Romand R (1996) Development of the auditory receptors of the rat: a SEM study. *Brain Res* 721:49–58

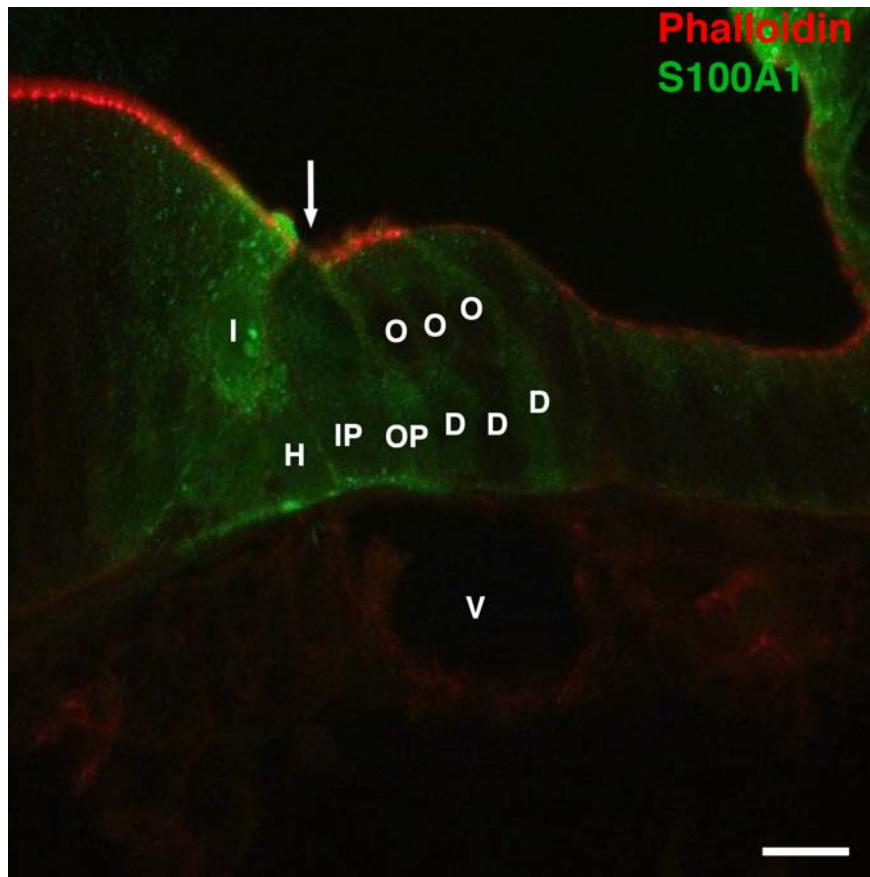




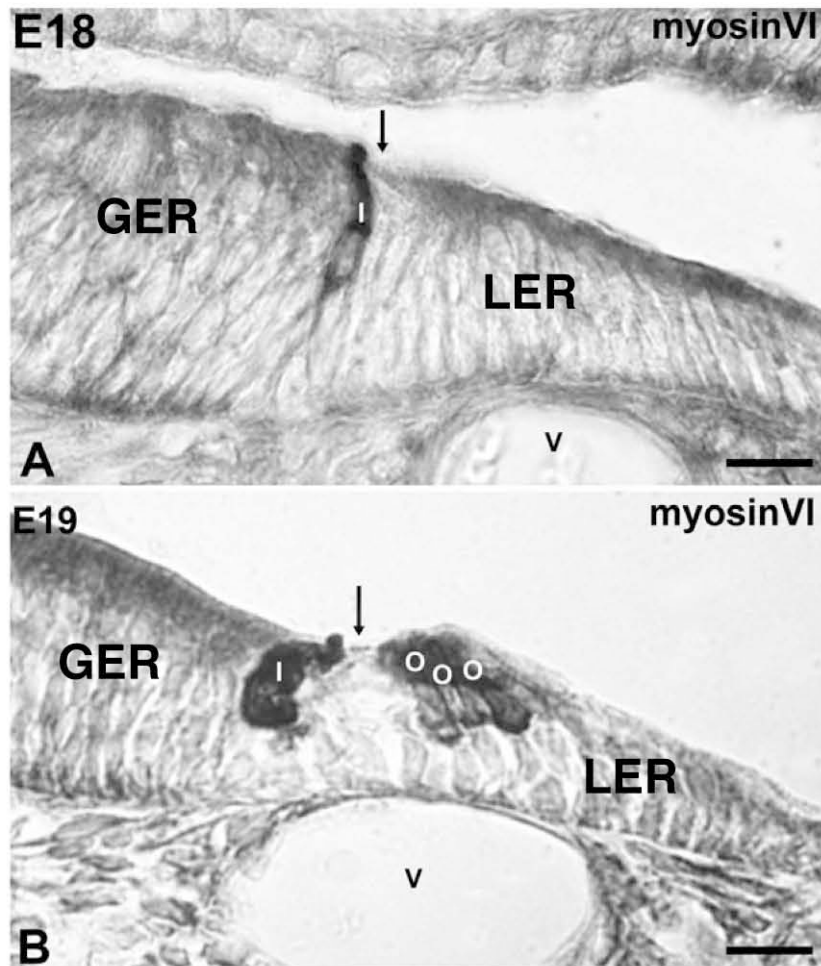
**Figure S1. Ultrathin section in the base of cochlear duct at E18.** The apical region of outer hair (O) cells is characterized by the presence of a cuticular plate (C) under the plasmic membrane and immature stereocilia (St). Scale bar: 0,5 $\mu$ m.



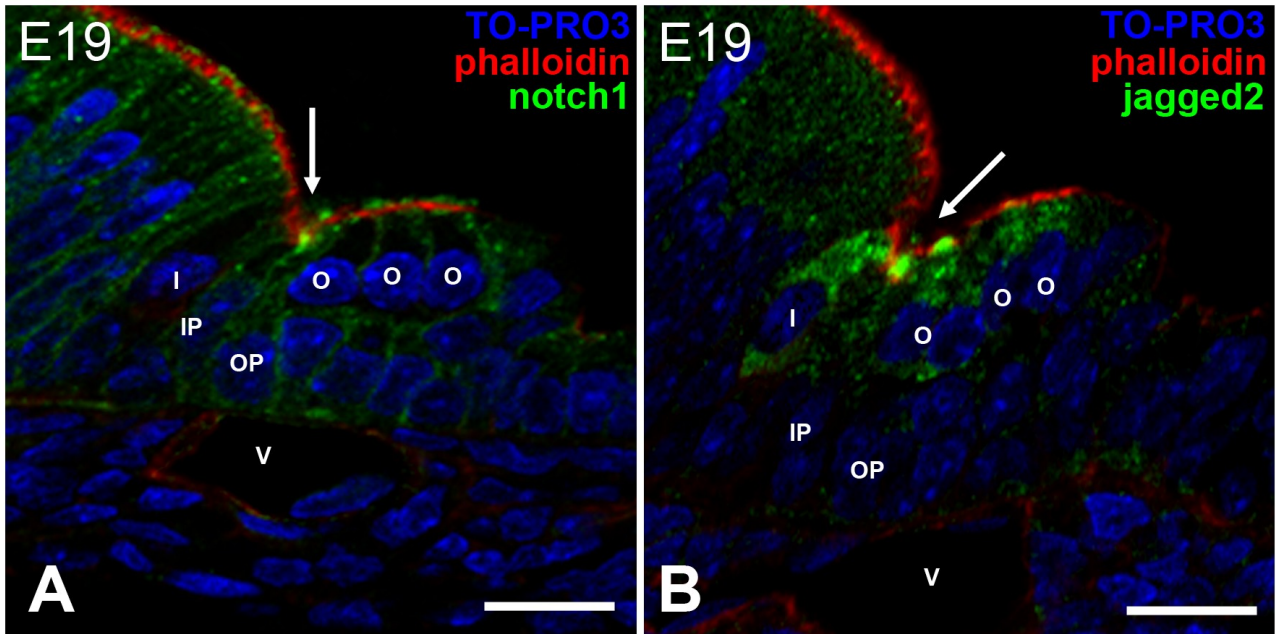
**Figure S2. Immunolabelling of a section in the base of cochlear duct at E19 using phalloidin (red) and p27<sup>kip1</sup> (green).** Arrow: depression of the dorsal epithelium; I: inner hair cell; O: outer hair cell; H: phalangeal cell; D: Deiters' cell; IP: inner pillar cell; OP: outer pillar cell; V: spiral vessel. Scale bar: 16 $\mu$ m.



**Figure S3. Immunolabelling of a section in the base of cochlear duct at E19 using phalloidin (red) and S100A1 (green).** Arrow: depression of the dorsal epithelium; I: inner hair cell; O: outer hair cell; H: phalangeal cell; D: Deiters' cell; IP: inner pillar cell; OP: outer pillar cell; V: spiral vessel. Scale bar: 16µm.



**Figure S4 – MyosinVI immunolabeled cryosections with DAB-labeled method of the dorsal epithelium of the cochlear duct at E18 and E19. A-B: Localization of the hair cells using myosinVI (black) in the base of cochlear duct at E18 (A) and E19 (B). Arrow: depression of the dorsal epithelium; GER: greater epithelial ridge; LER: lesser epithelial ridge; I: inner hair cell; O: outer hair cell; V: spiral vessel. Scale bar: 16µm.**



**Figure S5. A-B :** Immunolabelling of sections in the base of cochlear duct at E19 using notch1 (A, green), jagged2 (B, green), phalloidin (A-B, red) and TO-PRO3 (A-B, blue). Arrow: depression of the dorsal epithelium; I: inner hair cell; O: outer hair cell; IP: inner pillar cell; OP: outer pillar cell; V: spiral vessel. Scale bar: 16 $\mu$ m.

	<b>IHC</b>	<b>IHC</b>	<b>IHC</b>	<b>OHC</b>	<b>OHC</b>	<b>OHC</b>	<b>IP</b>	<b>IP</b>	<b>IP</b>
	Mean	SD	n	Mean	SD	n	Mean	SD	n
<b>E16 Base</b>	0	0	14	0	0	14	0	0	14
<b>E16 Middle</b>	0	0	18	0	0	18	0	0	18
<b>E16 Apex</b>	0	0	17	0	0	17	0	0	17
<b>E17 Base</b>	0,23	0,42	61	0	0	61	0,41	0,49	61
<b>E17 Middle</b>	0,07	0,26	28	0	0	28	0,25	0,43	28
<b>E17 Apex</b>	0	0	67	0	0	67	0	0	67
<b>E18 Base</b>	1	0	71	0,99	0,12	71	1	0	71
<b>E18 Middle</b>	0,76	0,43	99	0,66	0,48	99	0,78	0,42	99
<b>E18 Apex</b>	0	0	86	0	0	86	0	0	86
<b>E19 Base</b>	1	0	55	1	0	55	1	0	55
<b>E19 Middle</b>	0,91	0,29	77	0,83	0,38	77	0,94	0,25	77
<b>E19 Apex</b>	0	0	52	0	0	52	0	0	52

**Table S1 : Data for the quantitative study.** 89 organs of Corti were observed at three levels (base, middle and apex) : 8 at E16, 28 at E17, 30 at E18 and 23 at E19. For each level, 3-4 semithin sections were cut. IHC: inner hair cell; OHC: outer hair cell; IP: inner pillar cell.

# Statistical analysis

## Two-way ANOVA

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	16,83	P<0.0001
Turn of cochlea	19,73	P<0.0001
Age	31,55	P<0.0001

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	***	Yes
Level of cochlea	***	Yes
Age	***	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	15	37,11	2,47	44,52
Level of cochlea	5	43,51	8,7	156,6
Age	3	69,58	23,19	417,4
Residual	1266	70,35	0,06	

Number of missing values -24

## Bonferroni posttests

### IHC Base vs. IHC Middle

Age	IHC Base	IHC Middle	Difference	95% CI of diff.
E16	0	0	0	-0.2814 to 0.2814
E17	0,23	0,07	-0,16	-0.3382 to 0.02224
E18	1	0,76	-0,24	-0.3658 to -0.1202
E19	1	0,91	-0,09	-0.2304 to 0.04840

Age	Difference	t	P value	Summary
E16	0	0	P > 0.05	ns
E17	-0,16	2,94	P < 0.05	*
E18	-0,24	6,63	P<0.001	***
E19	-0,09	2,19	P > 0.05	ns

### IHC Base vs. IHC Apex

Age	IHC Base	IHC Apex	Difference	95% CI of diff.
E16	0	0	0	-0.2850 to 0.2850
E17	0,23	0	-0,23	-0.3687 to -0.08926
E18	1	0	-1	-1.127 to -0.8734
E19	1	0	-1	-1.153 to -0.8473

Age	Difference	t	P value	Summary
E16	0	0	P > 0.05	ns
E17	-0,23	5,49	P<0.001	***
E18	-1	26,45	P<0.001	***
E19	-1	21,93	P<0.001	***

### IHC Middle vs. IHC Apex

Age	IHC Middle	IHC Apex	Difference	95% CI of diff.
E16	0	0	0	-0.2670 to 0.2670
E17	0,07	0	-0,07	-0.2487 to 0.1067
E18	0,76	0	-0,76	-0.8734 to -0.6406
E19	0,91	0	-0,91	-1.051 to -0.7673

Age	Difference	t	P value	Summary
E16	0	0	P > 0.05	ns
E17	-0,07	1,34	P > 0.05	ns
E18	-0,76	21,78	P<0.001	***
E19	-0,91	21,48	P<0.001	***

**OHC Base vs. OHC Middle**

<u>Age</u>	<u>OHC Base</u>	<u>OHC Middle</u>	<u>Difference</u>	<u>95% CI of diff.</u>
E16	0	0	0	-0.2814 to 0.2814
E17	0	0	0	-0.1802 to 0.1802
E18	0,99	0,66	-0,33	-0.4528 to -0.2072
E19	1	0,83	-0,17	-0.3084 to -0.02960
<u>Age</u>	<u>Difference</u>	<u>t</u>	<u>P value</u>	<u>Summary</u>
E16	0	0	P > 0.05	ns
E17	0	0	P > 0.05	ns
E18	-0,33	9	P<0.001	***
E19	-0,17	4,06	P<0.001	***

**OHC Base vs. OHC Apex**

<u>Age</u>	<u>OHC Base</u>	<u>OHC Apex</u>	<u>Difference</u>	<u>95% CI of diff.</u>
E16	0	0	0	-0.2850 to 0.2850
E17	0	0	0	-0.1397 to 0.1397
E18	0,99	0	-0,99	-1.113 to -0.8594
E19	1	0	-1	-1.153 to -0.8473
<u>Age</u>	<u>Difference</u>	<u>t</u>	<u>P value</u>	<u>Summary</u>
E16	0	0	P > 0.05	ns
E17	0	0	P > 0.05	ns
E18	-0,99	26,08	P<0.001	***
E19	-1	21,93	P<0.001	***

**OHC Middle vs. OHC Apex**

<u>Age</u>	<u>OHC Middle</u>	<u>OHC Apex</u>	<u>Difference</u>	<u>95% CI of diff.</u>
E16	0	0	0	-0.2670 to 0.2670
E17	0	0	0	-0.1777 to 0.1777
E18	0,66	0	-0,66	-0.7724 to -0.5396
E19	0,83	0	-0,83	-0.9727 to -0.6893
<u>Age</u>	<u>Difference</u>	<u>t</u>	<u>P value</u>	<u>Summary</u>
E16	0	0	P > 0.05	ns
E17	0	0	P > 0.05	ns
E18	-0,66	18,88	P<0.001	***
E19	-0,83	19,64	P<0.001	***

**IHC: inner hair cell; OHC: outer hair cell**

## 9 | Présence d'une transition épithélio-mésenchymateuse partielle durant la morphogénèse post-natale de l'organe de l'audition chez le rat

Si la mise en place des différents types cellulaires de l'organe de Corti est un évènement relativement rapide durant le développement embryonnaire des mammifères (Kelley, 2007), l'organe de l'audition ne sera fonctionnel qu'aux alentours de P12 chez le modèle murin, soit quasiment 15 jours après l'apparition des cellules sensorielles et de soutien (Akil *et al.*, 2016). Chez le rat, la pleine maturité de l'organe sera atteinte autour de P25 (Whitlon, 1993). Durant sa maturation, plusieurs modifications morphologiques vont survenir. Les plus impressionnantes sont les ouvertures des espaces intercellulaires, à savoir le tunnel de Corti et les espaces de Nuel, qui sont concomitantes avec les changements de forme des cellules de soutien prenant place aux alentours de P12 chez le rat (Roth et Bruns, 1992a,b).

Durant cette période de maturation et de remodelage de l'organe sensoriel, Whitlon (1993) a observé une disparition de E-cadhérine au niveau des faces latérales des cellules piliers, des cellules de Deiters et des cellules sensorielles externes chez la souris à partir de P7. D'autre part, la présence de vimentine au sein de l'organe de Corti en développement a été rapportée ponctuellement (Kuijpers *et al.*, 1992; Wikström *et al.*, 1988). Ces différents éléments suggèrent la possible implication d'une EMT (voir 6.2) durant la maturation de l'organe de Corti.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons d'abord analysé en microscopie optique

le développement morphologique de l'organe de Corti chez le rat entre E18 et P25. Nous avons ensuite étudié la distribution de plusieurs marqueurs connus des EMT, des molécules d'adhésion cellulaire et des filaments intermédiaires, durant la même période de maturation de l'organe l'audition. Pour ce faire, nous avons appliqué des méthodes de marquages en immunofluorescence sur des cryosections de cochlées avec plusieurs anticorps anti-cytokératine et également des anticorps anti-vimentine, anti-E-cadhérine et anti-caténine- $\beta$ .

Nous montrons ainsi que la E-cadhérine est bien présente dans les cellules de l'organe de Corti entre E18 et P25, surtout au niveau des parties latérales de leur membrane. Ces résultats sont en accord avec ce qui avait été observé chez la souris (Whitlon, 1993) et chez le rat (Simonneau *et al.*, 2003). Néanmoins, notre étude systématique nous permet d'être les premiers à montrer que la E-cadhérine disparaît au niveau des membranes latérales des cellules piliers et des cellules de Deiters à partir de P8, période durant laquelle les espaces intercellulaires se forment. Suivant la disparition localisée de la E-cadhérine, la présence de caténine- $\beta$  diminue également à partir de P12.

Notre analyse des marquages en immunofluorescence révèle la présence de cytokératines dans les cellules de l'organe de Corti, avec l'exception notable des cellules sensorielles, entre E18 et P25. Ces observations sont en accord avec d'autres études réalisées plus ponctuellement chez le rat (Kuijpers *et al.*, 1992) et d'autres mammifères (Arnold et Anniko, 1990; Mogensen *et al.*, 1998; Sakuma, 1998). Il est particulièrement intéressant de noter que nous observons une augmentation temporaire de la présence de cytokératine dans les cellules de soutien aux alentours de P10, peu après l'ouverture des espaces intercellulaires. Cette augmentation pourrait être une réponse aux profondes modifications morphologiques que subissent les cellules de soutien durant cette période. Il est connu que le rôle des filaments intermédiaires ne se limite pas à une participation à la plasticité cellulaire. En effet, ils possèdent également une fonction dans la promotion de l'organisation cellulaire et de l'homéostasie en réponse à un stress cellulaire (Herrmann *et al.*, 2009b; Toivola *et al.*, 2010).

Bien que la vimentine ne soit pas un filament intermédiaire spécifique des cellules épithéliales mais un marqueur de cellules d'origine mésenchymateuses (Eriksson *et al.*, 2009),

notre analyse montre néanmoins sa présence dans les cellules de soutien de l'organe de Corti durant son développement. Contrairement à d'autres études (Bauwens *et al.*, 1991; Oesterle *et al.*, 1990), nous n'observons plus de vimentine dans les cellules de soutien de l'organe de l'audition adulte. En revanche, sa présence entre P8 et P10, dans l'ensemble des cellules de soutien semble indiquer que le rôle de la vimentine ne se limite pas uniquement aux cellules impliquées dans la formation des espaces intercellulaires mais qu'elle pourrait avoir un rôle plus général dans la maturation de l'organe de l'audition.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus indique clairement qu'une EMT partielle participerait au remodelage de l'organe de Corti. Cette EMT, qui implique les cellules de soutien, prend place lors d'une période critique du développement de l'organe de l'audition, à savoir l'ouverture des espaces intercellulaires et l'acquisition de sa morphologie définitive.

# Evidence for a partial epithelial–mesenchymal transition in postnatal stages of rat auditory organ morphogenesis

Nicolas Johnen · Marie-Emilie Francart ·  
Nicolas Thelen · Marie Cloes · Marc Thiry

Accepted: 7 May 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** The epithelial–mesenchymal transition (EMT) plays a crucial role in the differentiation of many tissues and organs. So far, an EMT was not detected in the development of the auditory organ. To determine whether an EMT may play a role in the morphogenesis of the auditory organ, we studied the spatial localization of several EMT markers, the cell–cell adhesion molecules and intermediate filament cytoskeletal proteins, in epithelium of the dorsal cochlea during development of the rat Corti organ from E18 (18th embryonic day) until P25 (25th postnatal day). We examined by confocal microscopy immunolabelings on cryosections of whole cochleae with antibodies anti-cytokeratins as well as with antibodies anti-vimentin, anti-E-cadherin and anti- $\beta$ -catenin. Our results showed a partial loss of E-cadherin and  $\beta$ -catenin and a temporary appearance of vimentin in pillar cells and Deiters between P8 and P10. These observations suggest that a partial EMT might be involved in the remodelling of the Corti organ during the postnatal stages of development in rat.

**Keywords** EMT · Cytoskeleton · Organ of Corti · Development

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00418-012-0969-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

N. Johnen (✉) · M.-E. Francart · N. Thelen · M. Cloes ·  
M. Thiry  
Department of Life Sciences, GIGA-Neurosciences, Unit of Cell  
and Tissue Biology, University of Liege, Avenue de l'hôpital 1,  
4000 Liege, Belgium  
e-mail: n.johnen@ulg.ac.be

M. Thiry  
e-mail: mthiry@ulg.ac.be

## Introduction

An epithelial–mesenchymal transition (EMT) is a biological process that allows a polarized epithelial cell to undergo multiple biochemical changes that enable it to assume a mesenchymal cell phenotype (Kalluri and Weinberg 2009; Savagner 2010; Thiery et al. 2009). During this process, epithelial cells loosen cell–cell adhesion, modulate their polarity and rearrange their cytoskeleton: intermediate filaments typically switch from cytokeratin to vimentin. They also enhance their motility capacity. The EMT plays key roles in the formation of the body plan and in the differentiation of multiple tissues and organs but it is also involved in tissue repair, tissue homeostasis, fibrosis, and carcinoma progression (Thiery et al. 2009).

Until now, EMT has been rarely mentioned in the inner ear organogenesis. In chick, EMT has been reported as a possible mechanism of semicircular canal morphogenesis (Kobayashi et al. 2008). More recently, an in vitro study has also indicated that sensory epithelial cells from mouse utricle can undergo an EMT to become cells expressing features of prosensory cells (Zhang and Hu 2012). By contrast, EMT has never been observed during auditory organ morphogenesis.

Auditory perception in mammals is mediated through a sensory epithelium, known as the organ of Corti (OC), located within the coiled cochlea in the ventral region of the inner ear (Kelley 2006; Kelley et al. 2009; Sato et al. 1999). The OC composed of two basic cell types: mechanosensory hair cells and nonsensory supporting cells. Hair cells are arranged into a single row of inner hair cells and three rows of outer hair cells. The population of supporting cells includes several highly specialised cell types: inner pillar cells, outer pillar cells, Deiters cells and phalangeal cells. These cells are arranged in a regular mosaic pattern running along the length of the snail-like cochlea from base to apex. The inner pillar

cells and outer pillar cells combine to form the tunnel of Corti, a fluid filled triangular space that separates the single row of inner hair cells from the first row of outer hair cells. The Nuel spaces are another interval in the OC that is situated between the outer pillar cells and the different rows of outer hair cells and Deiters cells.

The establishment of the OC is complex and the molecular mechanisms permitting its development are still little known (Mu et al. 1997; Kelley 2007). In rats, the OC grows up between E16 (16th embryonic day) and E18 from a band of epithelial cells located on the dorsal face of the cochlear duct (Thelen et al. 2009). This band of cells engaged in the development of the auditory organ has been also called zone of non-proliferating cells (ZNPC) because it is specifically labelled by p27<sup>Kip1</sup>, a cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor (Chen and Segil 1999). The different cells of the Corti organ are in place at E18 (Thelen et al. 2009). However, its development will be achieved around P25 (25th postnatal day) (Whitlon 1993). The most conspicuous maturational changes take place before P12 (Roth and Bruns 1992a, b). These changes are the formation of the Corti tunnel, of the Nuel spaces and the change in cell shape of the hair cells. Concomitantly to these striking changes that require profound cellular rearrangements, a loss of E-cadherin on the lateral surfaces of pillar, outer hair and, Deiters cells which lie adjacent to fluid spaces has been reported in mouse from P7 (Whitlon 1993). Likewise, a presence of vimentin has been detected in OC during mouse prenatal (Wikstrom et al. 1988) and rat postnatal (Kuijpers et al. 1992) developmental stages. Together these data suggest that an EMT could be involved in the OC development.

In order to know whether an EMT plays a role in the auditory organ morphogenesis, we investigated the spatial localization of different EMT markers, cell–cell adhesive molecules and intermediate filaments, in the dorsal epithelium of the cochlea during the development of Corti organ in rat from E18 up to P25. We analysed by confocal microscopy immunolabelings on entire cochlea's cryosections with various anti-cytokeratin antibodies as well as antibodies anti-vimentin, anti-E-cadherin and anti- $\beta$ -catenin. Our results show a partial loss of E-cadherin and  $\beta$ -catenin and a temporary appearance of vimentin in pillar cells and Deiters cells between P8 and P12. These observations suggest that a partial EMT may be responsible for opening of Corti tunnel and Nuel spaces.

## Materials and methods

### Animals and OC explants

Animal handling was carried out in compliance with the University of Liège Animal Care and Use Committee

guidelines that are in accordance with the declaration of Helsinki. Wistar rats were bred in our animal facility. Time-mated pregnant Wistar rats were killed from E18 to P25. The day of coitus was recorded as day 0 of gestation. Embryos were removed from the uterus and transferred into a glass Petri dish containing 0.1 M Sørensen's buffer (0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4). Watchmaker forceps were used to dissect the cochleae under a stereomicroscope. The cochleas were then isolated, free from surrounding tissues.

### Protein extraction and western blots

The rat tissue (cochlea, liver and lung) was homogenised in lysis buffer [20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 0.1 % (v/v) Triton X-100 and complete protease inhibitor cocktail (Roche, Brussels, Belgium)] with a sonicator (Sonic and materials, Danbury, UK) for 5–10 s at 4 °C of power 375 W 10–20 kHz. Extractions are incubated for 30 min at 4 °C then centrifuged at 12,000×g for 10 min. This step allowed the recovery of proteins in the supernatant.

Equivalent amounts of extracted proteins were loaded on each lane of a 12 % sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel. After electrophoresis, proteins were transferred onto Hybond<sup>®</sup>-LFP transfer membrane (GE Healthcare, Amersham bioscience, New Jersey, USA). After blocking in 3 % nonfat milk in Tris-buffered saline Tween, the membrane was incubated with primary antibody overnight at 4 °C and then with a secondary antibody for 1 h at room temperature. Immunoreactive signals were visualised by enhanced fluorescent (Typhoon 9400, GE Healthcare, Amersham bioscience, New Jersey, USA). Primary antibodies used were: anti-vimentin mouse monoclonal IgG (1:250 dilution; Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), anti-E-cadherin rabbit polyclonal IgG (1:100 dilution; Abcam, Cambridge, UK), anti-cytokeratin 8 (CK8) chicken polyclonal IgY (1:250 dilution; Abcam, Cambridge, UK), anti- $\beta$ -catenin rabbit monoclonal IgG antibodies (1:125 dilution; Abcam, Cambridge, UK) anti- $\beta$ -actin rabbit monoclonal IgG antibodies (1:1,000 dilution; Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). Secondary antibodies were fluorescein (FITC) donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK), rhodamine Red-X donkey anti-Rabbit IgG (Jackson immunoresearch, Suffolk, UK) and rhodamine Red-X donkey anti-chicken IgY (Jackson immunoresearch, Suffolk, UK) used at 1:2,500 (see supplemental data Fig. S1).

### Preparation of OC for examination by light microscopy

The cochleas were fixed for 60 min at 4 °C in a solution composed of 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M Sørensen's buffer. After several washes in the same buffer, the

samples were then postfixed for 60 min with 2 % osmium tetroxide, washed in deionized water, dehydrated through graded ethanol (70, 95, 100 %), and embedded in Epon for 24–48 h at 60 °C. Semithin sections (1 µm thick) were obtained by means of an ultramicrotome (Reichert Ultracut E) equipped with a diamond knife. They were stained with 0.5 % toluidine blue in 1 % carbonate sodium and examined under an Olympus FSX100 microscope.

### Immunocytochemistry

The cochleas were fixed for 60 min at 4 °C in a solution composed of 4 % formaldehyde in Sørensen's buffer (pH 7.4). After several washes in the same buffer, the samples were incubated in five baths of 30 % saccharose in Sørensen's buffer (20 min each), embedded in gelatin 7.5 %, sucrose 15 % and Sørensen's buffer mix for 15 min at 30 °C, and plunged into an isopentane bath on dry ice. Cryosections (14 or 30 µm thick) were obtained by means of a cryostat (Microm HM 560, Prosan).

For immunolabeling, cryosections were rinsed in PBS (140 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) and permeabilized for 10 min at room temperature in 1 % Triton X-100 in PBS. After being washed in PBS, the sections were soaked for 30 min at 37 °C in 10 % normal goat serum (NGS) in PBS, immersed for 30 min at 37 °C in the primary antibody containing 5 % NGS, washed in PBS, and immersed for 30 min at 37 °C in the secondary antibody. Finally, the cryosections were rinsed in PBS and mounted with Citifluor AF1 (Laborimpex, Brussels, Belgium). The primary antibodies were: anti-p27<sup>kip1</sup> mouse monoclonal IgG (1:100 dilution; Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), anti-myosin VI rabbit monoclonal IgG (1:150 dilution; Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), anti-vimentin mouse monoclonal IgG (1:100 dilution; Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), anti-E cadherin rabbit polyclonal IgG (1:100 dilution; Abcam, Cambridge, UK;), anti-Cytokeratin-Pan mouse monoclonal IgG (1:100; Sigma, St. Louis, USA), anti-Cytokeratin 4 rabbit polyclonal IgG (1:100; Abcam, Cambridge, UK), anti-Cytokeratin 5 rabbit monoclonal IgG (1:100; Abcam, Cambridge, UK), anti-Cytokeratin 7 mouse monoclonal IgG (1:100 dilution; Abcam, Cambridge, UK), anti-Cytokeratin 8 (CK8) chicken polyclonal IgY (1:100 dilution; Abcam, Cambridge, UK) and anti-β-catenin rabbit monoclonal IgG antibodies (1:200 dilution; Abcam, Cambridge, UK). Specificities of different primary antibodies were summarised in Table S1 and in Fig. S1 (see supplemental data). The secondary antibodies used were: goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:250 dilution; Molecular Probes, Leiden, The Netherlands;  $h\nu_{\text{ex}}$  495 nm/ $h\nu_{\text{em}}$  519 nm), goat anti-rabbit Alexa Fluor 594 (1:250 dilution; Molecular Probes, Leiden, The Netherlands;  $h\nu_{\text{ex}}$  590 nm/ $h\nu_{\text{em}}$  617 nm) and goat anti-chicken Alexa Fluor

594 (1:250 dilution; Molecular Probes, Leiden, The Netherlands;  $h\nu_{\text{ex}}$  590 nm/ $h\nu_{\text{em}}$  617 nm). In some case, we used DAPI (1:50,000 dilution; 4',6-DiAmidino-2-Phenylindole; Sigma, St. Louis, USA;  $h\nu_{\text{ex}}$  372 nm/ $h\nu_{\text{em}}$  456 nm) to visualise the cell nuclei. As a negative control, the primary antibody was omitted. In each case, no labelling occurred.

Slides were examined under an IX71 confocal microscope (Olympus). Acquisitions were made using either a ×40 or a ×60 objective. Optical sections were analysed with softwares FV10-ASW 3.0 Viewer (Olympus) and Imaris (Biplane Scientific). All images are single sections.

## Results

### Morphological analysis of OC development from E18 to P25 in rat

To successively follow the different steps of the OC formation in the cochlear canal, we have examined semithin sections in the base of samples taken in rat embryos aged from 18 to 22 days and in newborn rats aged from 0 to 25 days (Fig. 1a–o). In the Fig. 1, as in the following figures, we have shown that the developmental stages exhibiting the most interesting results.

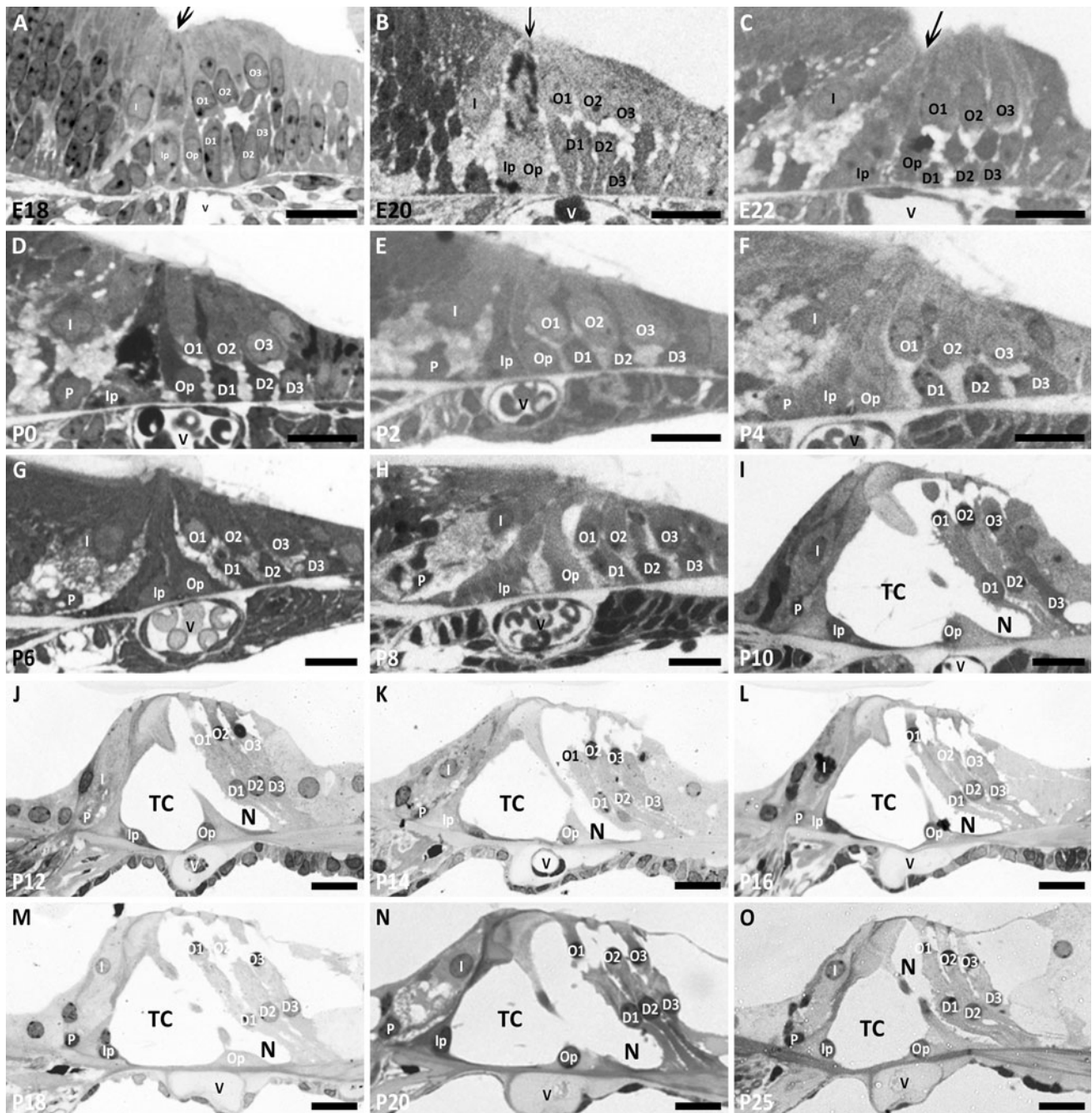
At E18 (Fig. 1a), the cochlear duct is lined with a pseudostratified epithelium. We observe a depression separating the dorsal epithelium in two parts: the GER, on the modiolar side, in continuity with the future Reissner membrane, and the LER, on the striolar side, in continuity with the future stria vascularis. It is interesting to note that, at this stage, the scala tympani and vestibuli are not formed yet.

From E20 (Fig. 1b), the different cell types of the OC are in place. The inner hair cells, outer hair cells, pillar cells and Deiters cells are clearly recognisable. At P0 (Fig. 1d), the outer sulcus becomes a monostratified epithelium whereas the inner sulcus remains a pseudostratified epithelium. At this stage, the scala tympani and vestibuli are obvious.

At P8 (Fig. 1h), the tunnel of Corti and the Nuel spaces start to open. These fluid spaces will continue to enlarge until P25 (Fig. 1h–o) from the Corti tunnel to the modiolar side of the OC. Concomitantly to the opening of the fluid spaces, the OC, including the hair cells and the supporting cells, raises. At P10 (Fig. 1i), the inner sulcus becomes a monostratified epithelium.

Partial loss of E-cadherin between the pillar cells and between the Deiters' cells from P8

To determine whether a loss of cell–cell adhesion occurs during the OC morphogenesis, we realised immunolabellings



**Fig. 1** Morphological analysis of the dorsal epithelium of the cochlear duct from E18 to P25 (a–o). All sections are stained with toluidine blue, oriented in the same way (*left* modiolar region, *bottom* dorsal wall of the cochlear duct) and corresponded to the basal region of the cochlea. *Arrows* indicate a depression of the dorsal epithelium,

*D(1–3)* Deiters' cell, GER greater epithelial ridge, *I* inner hair cell, *Ip* inner pillar cell, *N* Nuel's space, *O(1–3)* outer hair cell, *Op* outer pillar cell, *P* phalangeal cell, *TC* Tunnel of Corti, *V* spiral vessel. Bars 10 μm

on entire cochlear cryosections with antibody anti-E-cadherin (Fig. 2a–f).

Under these experimental conditions, the E-cadherin labelling is exclusively detected in the epithelial cells (Fig. S2). The pattern of immunoreactivity was identical with

that previously observed in rat (Simonneau et al. 2003). The E-cadherin labelling is found mainly in the external part of the OC whatever the developmental stages studied. The inner pillar cells are also E-cadherin-positive for all the developmental stages examined. The labelling is

observed on the lateral surfaces of cell membrane between the pillar cells and between the Deiters cells and their hair cells.

From E18 to P6 (Fig. 2a, b), we observe an intense labelling within the auditory epithelium except for the cells in the inner hair cell region. The labelling is particularly obvious between inner and outer pillar cells, between Deiters cells and their outer hair cells.

From P8 to P25 (Fig. 2c–f), when the tunnel of Corti and the Nuel spaces are opened, E-cadherin is retained only by those parts of the cells that are still in contact. Inside the inner and outer pillar cells and the Deiters cells, only their heads and their bases are E-cadherin positive.

To better demonstrate the loss of E-cadherin labelling between the inner and outer pillar cells, we have compared the OC labelling observed in longitudinal axis at P6, P10 and P16 (Fig. 3a–c). At P6 (Fig. 3a), an evident E-cadherin labelling is present all along the contact surface between the inner and outer pillar cells. At P10–16 (Fig. 3b, c), a reduction of E-cadherin labelling is observed on the lateral surfaces of cell membranes between inner and outer pillar cells which come in contact with the tunnel of Corti. By contrast, the apical surfaces of outer pillar cells, which are covered with the inner pillar cells, are strongly E-Cadherin-positive. A labelling also persists between the inner pillar cells and between the inner pillar cells and their adjacent phalangeal cells. The same reduction of labelling can be seen between the outer pillar cells and the first row of Deiters cells when the Nuel spaces open.

#### Loss of $\beta$ -catenin in supporting cells of the OC from P12

In addition to E-cadherin, we have also studied the spatio-temporal localization of the cadherin-linked molecule  $\beta$ -catenin during OC morphogenesis (Fig. 4a–f).

We observe that all the epithelial cells are  $\beta$ -catenin-positive (Fig. S2). This is in total agreement with a previous study in rat (Simonneau et al. 2003). As previously reported (Kim et al. 1998), a  $\beta$ -catenin labelling is further found in the mesenchymal cells of the basilar membrane.

From E18 to P10,  $\beta$ -catenin is detected in all the epithelial cells of the cochlea duct, including the cells of the OC and the inner and outer sulcus (Fig. 4a–d). The labelling is essentially localized on the lateral surfaces of cell membranes. At P10, the fluorescent signal becomes more pronounced on the apical surfaces of outer pillar cells which are covered with the inner pillar cells (Fig. 4d).

From P12 to P25, the labelling of supporting cells situated in the external part of the OC reduces. This signal reduction is already well visible in the outer pillar cells at P12 (Fig. 4e). An attenuation of the fluorescent signal is also found in the inner pillar cells from the 14th day after

birth. At this stage, an intense fluorescent spot is present in the Deiters cells under their outer hair cell. At P25, the labelling of Deiters cells is restricted to small spots at the lateral edges, near to the apical surfaces, which are in contact with their outer hair cells, and to large spots under their outer hair cells (Fig. 4f).

To know whether epithelial cells from the OC undergo a remodelling of their cytoskeleton, and in particular of their intermediate filaments, during development, we study the spatial-temporal localization of cytokeratins and vimentin on cryosections of rat cochlea from E18 to P25. We use an antibody against vimentin and various antibodies directed against cytokeratins: anti-cytokeratin pan (recognising cytokeratin 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 and 19), anti-cytokeratin 4, anti-cytokeratin 5, anti-cytokeratin 7, and anti-cytokeratin 8. To identify the different cell types of the embryological and postnatal epithelium, double labellings are realised either with myosin VI, early marker and typical of the hair cells, or with p27kip1, marker specific for the supporting cells present in the ZNPC.

#### Temporary presence of vimentin in pillar and Deiters cells at P8–10

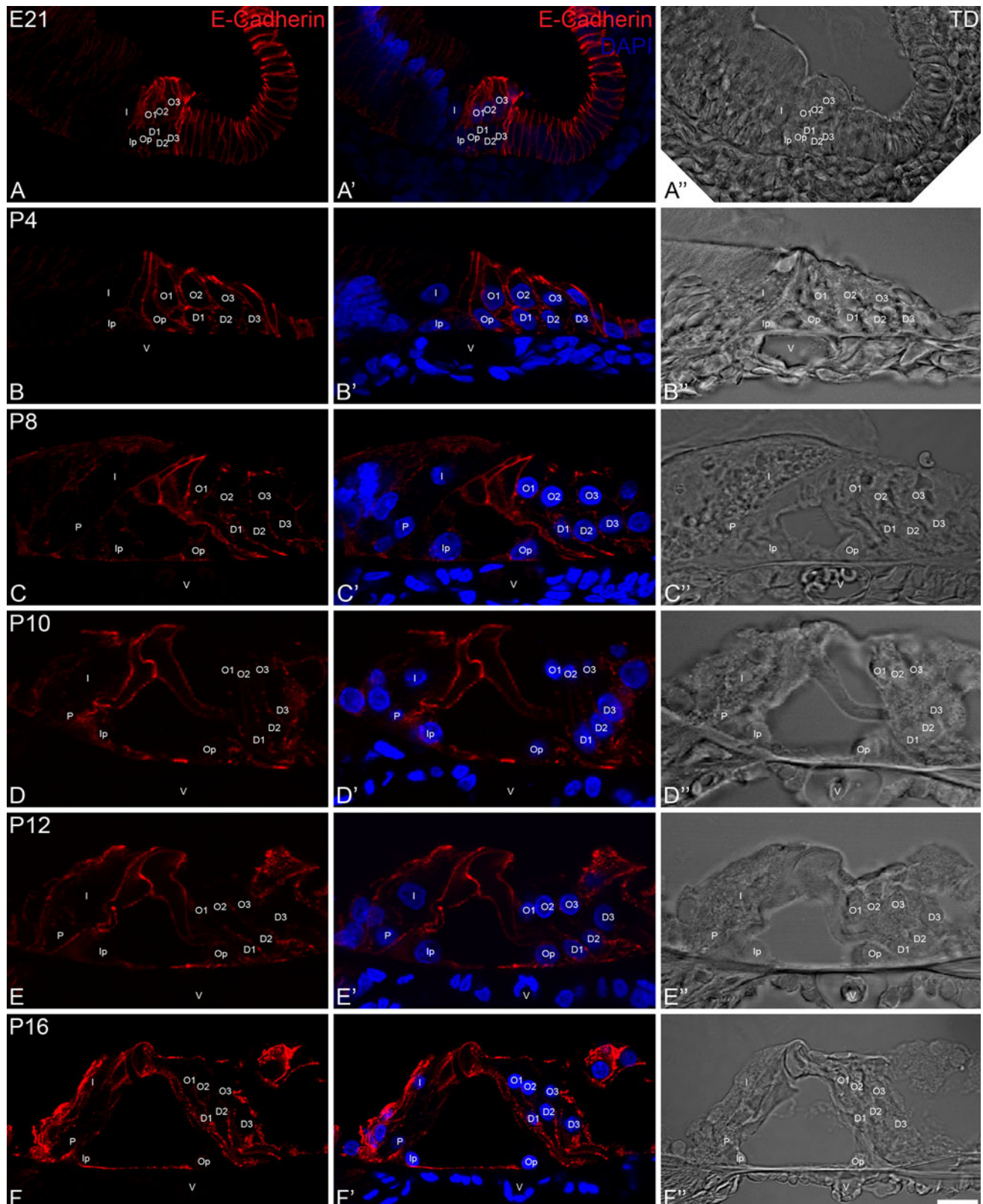
Independent of the developmental stage analysed, a vimentin labelling is found in the basilar membrane, the endothelium of the spiral vessel and the cartilaginous cells (Fig. S2). By contrast, no signal is revealed in nervous cells of the spiral ganglia with this antibody. The pattern of immunoreactivity was identical to that previously observed in rat (Osborn et al. 1984). In the OC, only the supporting cells can be vimentin-positive, hair cells are never labelled.

Before birth (Fig. 5a), vimentin is detected essentially in the future basilar membrane, the future Reissner membrane and the future stria vascularis. A very weak labelling is also found in the external part of the OC and in the cells of outer sulcus.

Between P0 and P6 (Fig. 5b), the labelling is localized preferentially in the basal part of the phalangeal cell, the pillar cells, especially the inner pillar cells, and the Deiters cells. The cells of the inner and outer sulcus are also labelled.

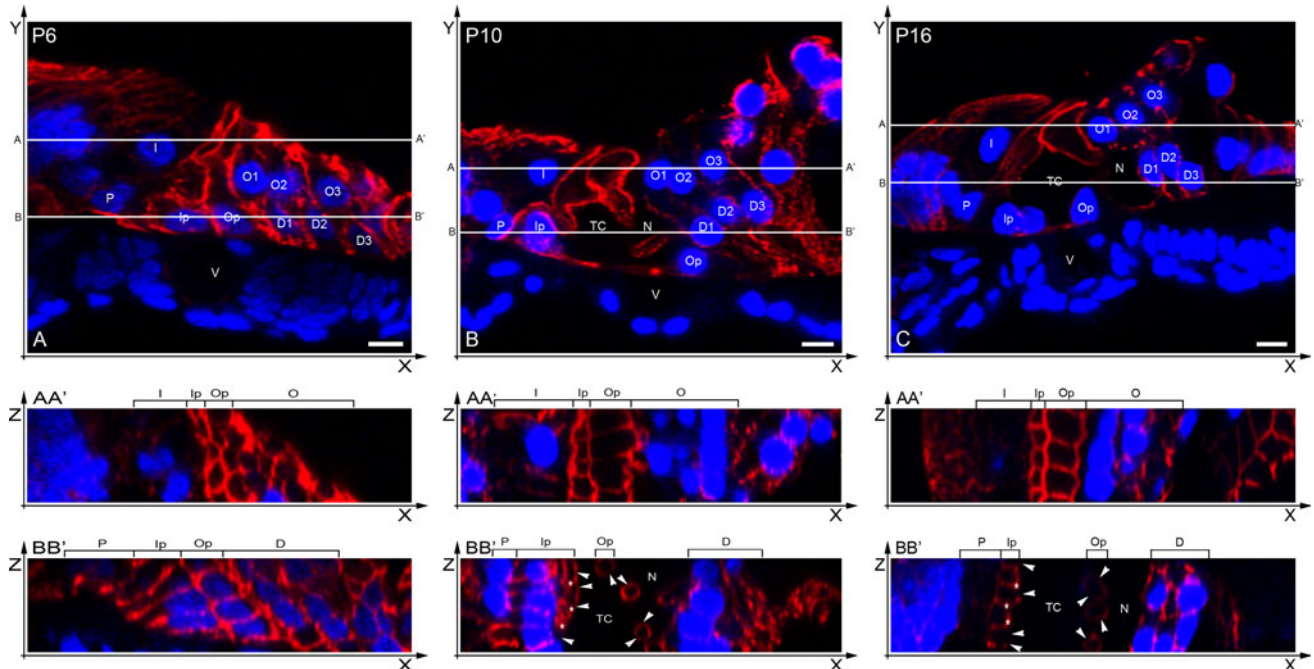
Between P8 and P10 (Fig. 5c, d), a strong signal intensity is obvious in the OC. In addition to an intense labelling of the basal region in all supporting cells, a diffuse labelling is also present through all their cytoplasm.

From P12 to P25 (Fig. 5e, f), the labelling decreases and finishes to disappear in the supporting cells of the OC. At P12 (Fig. 5e), the vimentin labelling appears to be structured in fibres situated on the whole height of the pillar cells. At P16, the basal parts of the phalangeal and Deiters cells are still labelled (Fig. 5f).



**Fig. 2** E-Cadherin immunolabelling within the dorsal epithelium of the cochlear duct from E21 to P16. **a–f** Immunolocalization of the E-Cadherin (red). **a'–f'** Merged image with cell nuclei stained with DAPI (blue). **a''–f''** Visualisation of the OC by transmission detector.

*D(1–3)* Deiters' cell, *Ip* inner pillar cell, *I* inner hair cell, *N* Nuel's spaces, *O(1–3)* outer hair cell, *Op* outer pillar cell, *P* phalangeal cell, *TC* tunnel of Corti, *V* spiral vessel. Bar 10  $\mu$ m



**Fig. 3** E-Cadherin immunolabelling of the organ of Corti at P6, P10 and P16 in transversal view projection on the *XY* axis. The lines indicate the starting level for the projection on the *XZ* level shown on *XX'* of the OC and they are signalled below by *XX'*. *XX'* projection of the organ of Corti on the *XZ* plane. Arrowheads/Asterisks represent

loss/maintaining of E-cadherin labelling (red), respectively. Cell nuclei are stained with DAPI (blue). *D(1–3)* Deiters' cell, *I* inner hair cell, *Ip* inner pillar cell, *N* Nuel's spaces, *O(1–3)* outer hair cell, *Op* outer pillar cell, *P* phalangeal cell, *TC* tunnel of Corti, and *V* spiral vessel. Bars 15 μm

**Intense expression of cytokeratin in supporting cells at P10–12**

A labelling is only obtained with antibodies anti-cytokeratin pan and anti-cytokeratin 8 (Fig. 6a–f). It is similar with both antibodies (unshown results). Only the epithelial cells of the cochlea can exhibit a labelling. No labelling occurs in the cells of mesenchymal origin at all developmental stages examined in this study (Fig. S2). This labelling is in total agreement with previous observations made in rat (Ramaekers et al. 1987). In the OC, only the supporting cells were cytokeratin-positive; the hair cells were never labelled whatever the antibodies used and the developmental stages studied.

In transversal sections between E18 and E21 (Fig. 6a), the dorsal epithelium of the cochlear duct is lightly cytokeratin-positive, specifically the supporting cells. In addition the OC labelling, some cells of the outer sulcus as well as the epithelia of the future Reissner membrane and stria vascularis are also highly positive with these antibodies.

Between E22 and P6 (Fig. 6b), a signal is exclusively found in the supporting cells, particularly the phalangeal cell at their lateral edges, near to their apical surfaces, which are in contact with their inner hair cells and their inner pillar cells. The cells of outer sulcus are also cytokeratin-positive.

Between P8 and P12 (Fig. 6c–e), an intense labelling is present in the cochlear duct. All the supporting cells are labelled but in a lesser extent the pillar cells. On the other hand, the labelling decreases strongly in the outer sulcus cells.

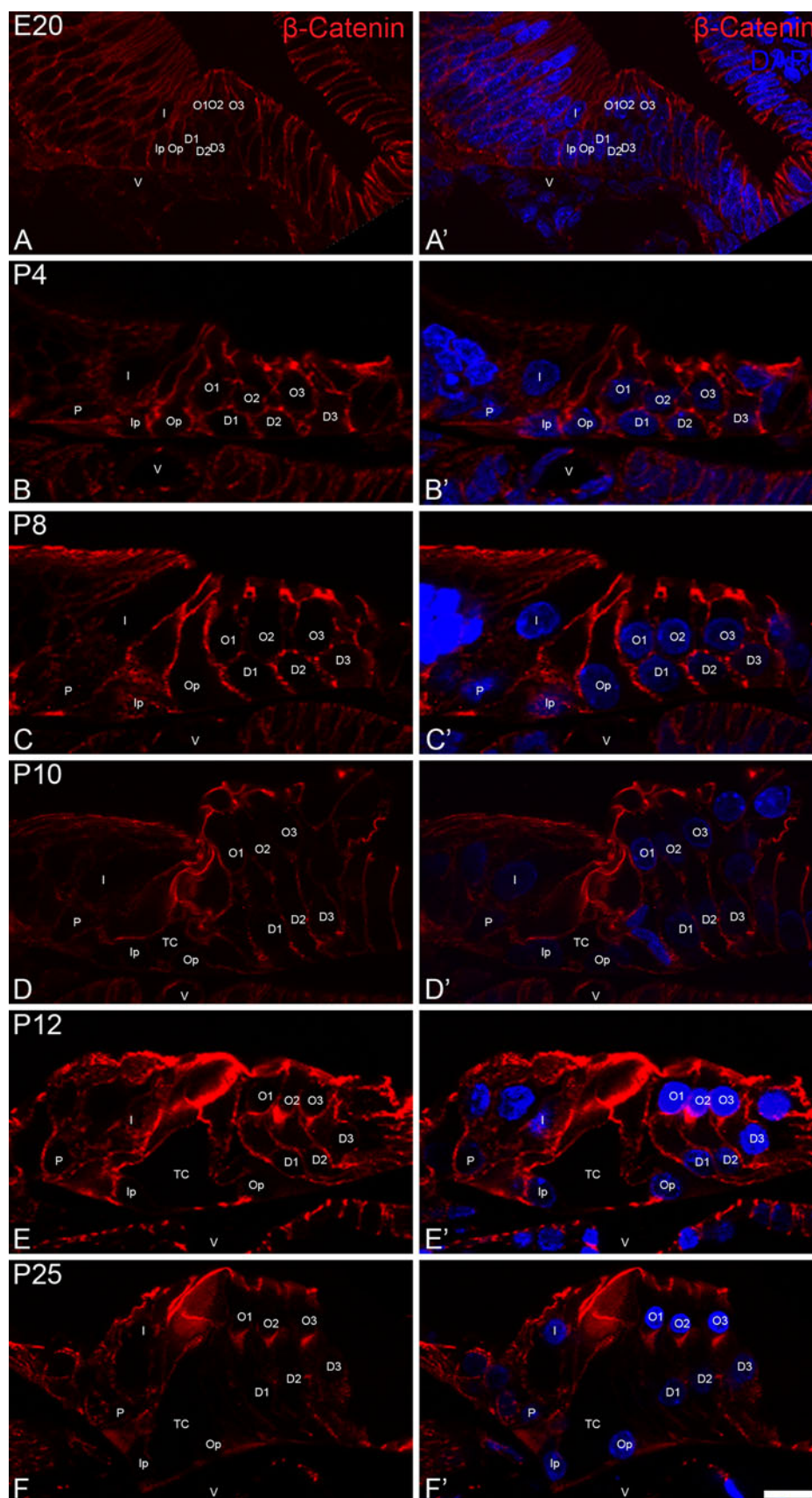
From P14 to P25 (Fig. 6f), although much weaker, the fluorescent signal is present in the supporting cells at their baso-lateral surfaces.

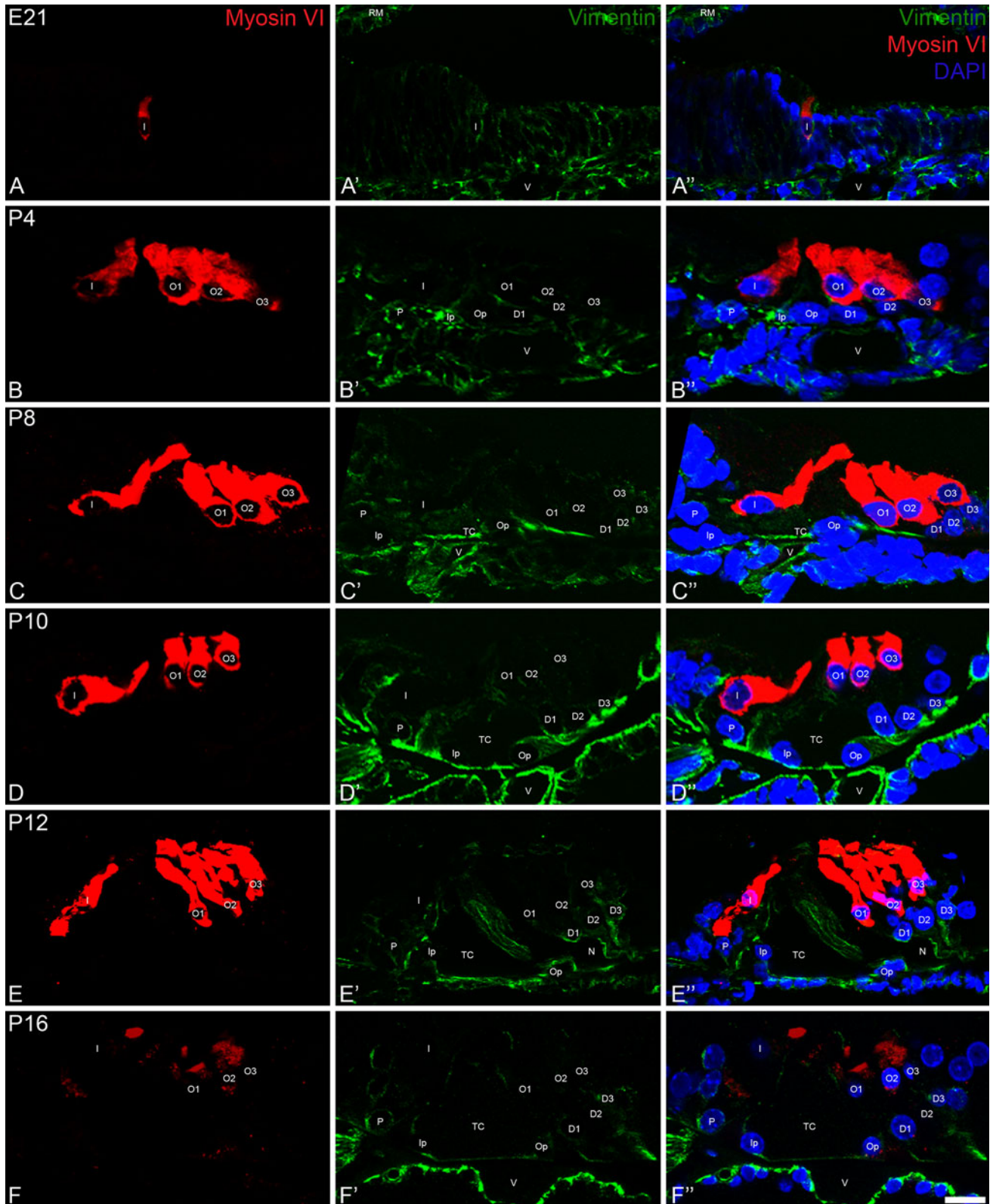
**Discussion**

**Local loss of adhesion between supporting cells of the OC from P8**

Our results indicate clearly that the cell adhesion molecule, E-cadherin, is preferentially found in the lateral membranes of the cells situated in the external part of the OC from E18 to P25. This observation is in good agreement with previous data described in rats (Simonneau et al. 2003) and in mice (Whitlon 1993). We show further that E-cadherin molecules disappear from the lateral cell membranes of pillar and Deiters cells in basal turn of cochlea at P8, namely, when fluid spaces—Corti tunnel and Nuel spaces—form in rats. From this moment, E-cadherin molecules are present only on the lateral edges, near to the apical and basal surfaces, of pillar and Deiters cells,

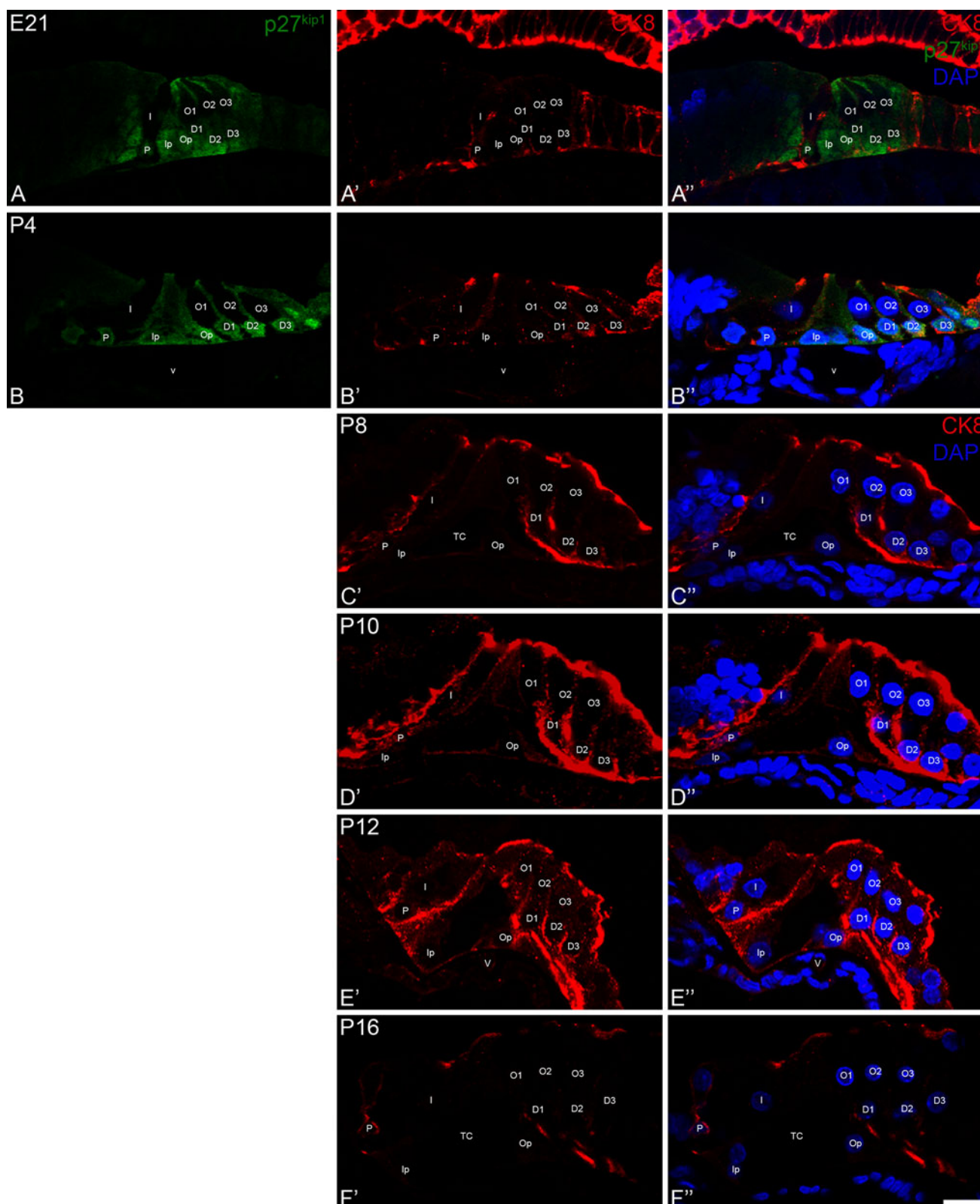
**Fig. 4**  $\beta$ -catenin immunolabelling within the dorsal epithelium of the cochlear duct from E21 to P25. **a-f** Immunolocalization of the  $\beta$ -Catenin (red). **a'-f'** Merged image with cell nuclei stained with DAPI (blue). *D(1-3)* Deiters' cells, *Ip* inner pillar cell, *I* inner hair cell, *N* Nuel's spaces, *O(1-3)* outer hair cell, *Op* outer pillar cell, *P* phalangeal cell, *TC* tunnel of Corti, *V* spiral vessel. *Bar* 10  $\mu$ m





**Fig. 5** Vimentin immunolabelling within the dorsal epithelium of the cochlear duct from E21 to P16. **a–f** Localization of the hair cells using Myosin VI (red). **a'–f'** Immunolocalization of the vimentin (green). **a''–f''** Merged image with cell nuclei stained with DAPI (blue).

*D(1–3)* Deiters' cells, *Ip* inner pillar cell, *I* inner hair cell, *N* Nuel's spaces, *O(1–3)* outer hair cell, *Op* outer pillar cell, *P* phalangeal cell, *TC* tunnel of Corti, *V* spiral vessel. Bar 10  $\mu$ m



**Fig. 6** Cytokeratin 8 immunolabelling within the dorsal epithelium of the cochlear duct from E21 to P16. **a–b** Localization of the supporting cells using p27<sup>kip1</sup> (green). **a'–f'** Immunolocalization of the cytokeratin 8 (red). **a''–f''** Merged image with cell nuclei stained

with DAPI (blue). *D(1–3)* Deiters' cells, *Ip* inner pillar cell, *I* inner hair cell, *N* Nuel's spaces, *O(1–3)* outer hair cell, *Op* outer pillar cell, *P* phalangeal cell, *TC* tunnel of Corti, *V* spiral vessel. Bar 10  $\mu$ m

particularly at their connections. The absence of E-cadherin in the internal membranes of pillar cells which will face the opening of the Corti tunnel had already been noted at P7 in mouse (Whitlon 1993). Such observation had never been reported in rat because the distribution of E-cadherin has not been studied systematically during the postnatal development (Simonneau et al. 2003). However, a loss of E-cadherin-linked molecule  $\beta$ -catenin between the pillar cells had been observed at P6 in rat (Simonneau et al. 2003). We also show that the  $\beta$ -catenin labelling reduces strongly on the lateral cell membranes of pillar and Deiters cells in basal turn of cochlea from P12, suggesting that the loss of cadherin molecules occurs before that of  $\beta$ -catenin molecules.

#### Increased expression of cytokeratins in supporting cells around P10

Contrary to the actin microfilaments and microtubules cytoskeleton, intermediate filaments have distinct tissue-specific functions (Eriksson et al. 2009). Hence, in the epithelial cells, a highly diverse group of cytokeratins is expressed. Our results reveal that cytokeratins are only detected in supporting cells, but not in sensory cells, of the OC epithelium from E18 to P25. We also show that only cytokeratins typical for simple epithelium labelled the OC. These results are in agreement with previous data obtained in rat during some developmental stages (Kuijpers et al. 1991a, b, 1992) and in other adult mammal species (Mogensen et al. 1998; Arnold and Anniko 1990; Sakuma 1998).

An interesting observation is the increase of labelling in the supporting cells around P10, shortly after the beginning of the opening of the Corti tunnel and Nuel spaces. Later, the labelling decreases and becomes essentially limited to the basal and apical areas of supporting cells. The increase of cytokeratin expression around P10 might be in relation with the development of structural and mechanical integrity of supporting cells just after the opening of the fluid spaces and the increase in height of the OC. One might also ask whether the profound morphological changes might also induce the increase of cytokeratin expression. Indeed, it is well known that intermediate filament levels increase dramatically in response to stress and that, in addition to their primary role in cell plasticity, intermediate filaments also function as highly specialised cytoskeletal stress proteins that promote cellular organization and homeostasis (Herrmann et al. 2009; Toivola et al. 2010).

#### Temporary appearance of vimentin in supporting cells at P8–10

Although vimentin is not an intermediate filament protein typical for the epithelial cells but it is a marker for the

mesenchymal cells (Eriksson et al. 2009), we show in this study the presence of vimentin in supporting cells and not in hair cells in the OC from E18 to P25. The presence of vimentin in the OC has rarely been reported during its development (Kuijpers et al. 1992) but it has been repeatedly described in adult in pillar and Deiters cells (Oesterle et al. 1990; Bauwens et al. 1991). However, at P25 we do not observe vimentin in the OC. This is in agreement with a previous study realised on rat at P40 (Kuijpers et al. 1992). The temporary appearance of vimentin between P8 and P10 is not limited to the supporting cells bordering on the fluid spaces but involved all the supporting cells including phalangeal cells. This result seems to indicate that this temporary appearance of vimentin in the OC is not directly involved in the formation of fluid spaces but could have a more general role in the postnatal development of the OC. It is also interesting to note that mice lacking vimentin developed and reproduced without an obvious phenotype (Colucciguyon et al. 1994). Furthermore, no compensatory expression of another intermediate filament could be demonstrated (Colucciguyon et al. 1994). Complementary studies on this mice mutant are now required to better understand the role of vimentin in OC development.

#### Evidence of a partial EMT in postnatal morphogenesis of the OC

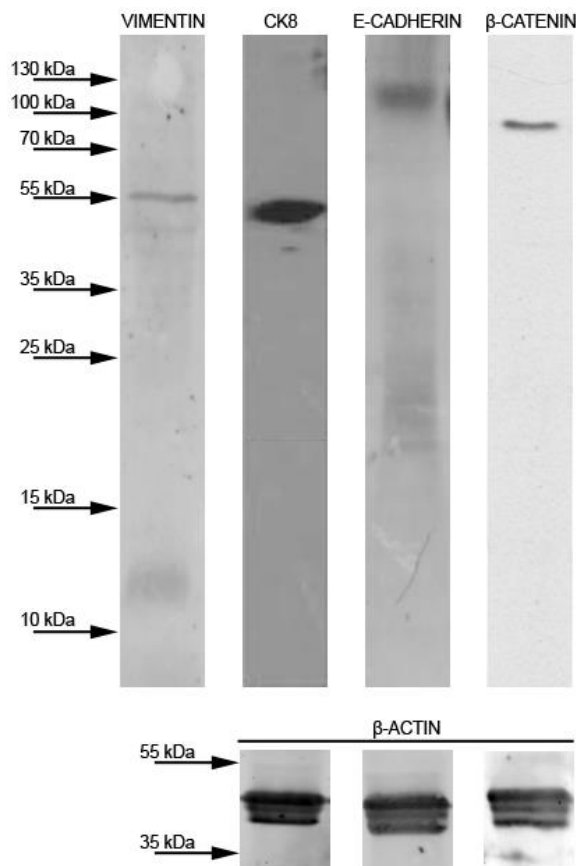
It is well known that the EMT plays crucial role in the differentiation of multiple tissues and organs (Thiery et al. 2009; Savagner 2010), in particular the development of the semicircular canals (Kobayashi et al. 2008). However, no EMT has been described to date in the development of the auditory organ. EMT involves the formation of motile cells from parent epithelial cells that are not themselves motile (Zeisberg and Neilson 2009). This change is accompanied by loss of cell adhesion and the appearance of markers typical of mesenchymal cells, such as vimentin (Yilmaz and Christofori 2009; Zeisberg and Neilson 2009; Savagner 2010). In this work, we show a loss of cell adhesion in the OC. However, only the membrane surfaces in contact with the fluid spaces lose their E-cadherin molecules. A previous study also revealed the appearance of T-cadherin molecules in pillar cells lining the tunnel of Corti after birth (Simonneau et al. 2003). T-cadherin is expressed in cells sharing a mesenchymal phenotype (Riou et al. 2006; Simonneau et al. 2003). Our results show further that this reduction in cell adhesion is accompanied by an increased expression of vimentin, a marker characteristic of mesenchymal cells (Zeisberg and Neilson 2009). Curiously, this increased expression of vimentin is not concomitant with a reduction in the expression of cytokeratins, a marker typical of epithelial cells, as generally described for EMT (Savagner 2010). All these results clearly suggest that a

partial EMT could be involved in the remodelling of the OC during postnatal development in rat. The EMT would occur at a critical time during development of the Corti organ. Indeed, it is between P8 and P12 in rat that occur deep morphological changes of the Corti organ, including the formation of fluid spaces and the increase in height of the epithelium. At P12 in rat, the OC is considered to be functional even if its maturation continues until P25 (Savagner 2010). Further studies are now needed to identify the molecular factors responsible for the implementation of the EMT.

**Acknowledgments** The authors thank Mrs. Patricia Piscicelli for her skilful technical assistance. They would like also to thank Sandra Ormenese (GIGA-Imaging and Flow Cytometry, University of Liège) and Dr Pierre Leprince (Western blots, University of Liège) for their technical supports. This work was supported by the Fonds de la Recherche Scientifique and the Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture.

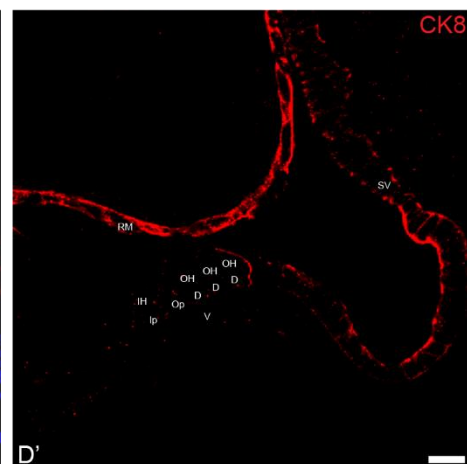
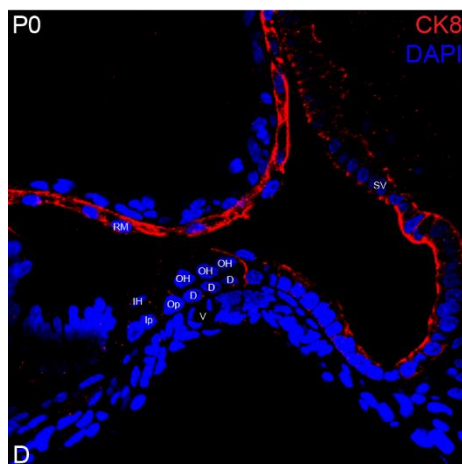
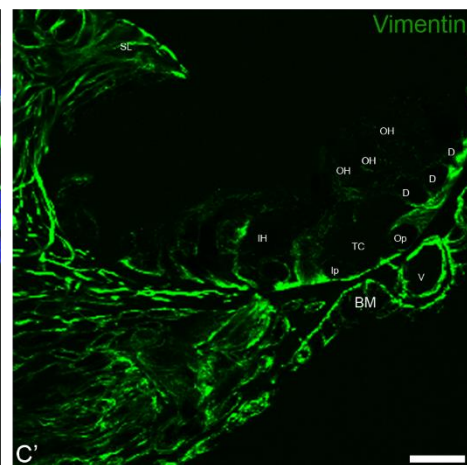
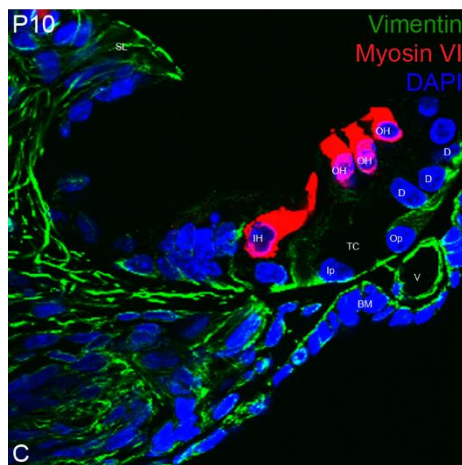
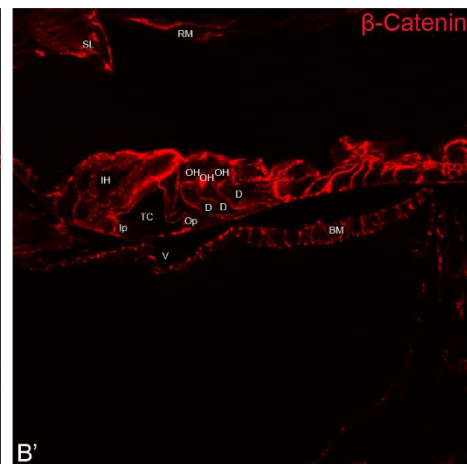
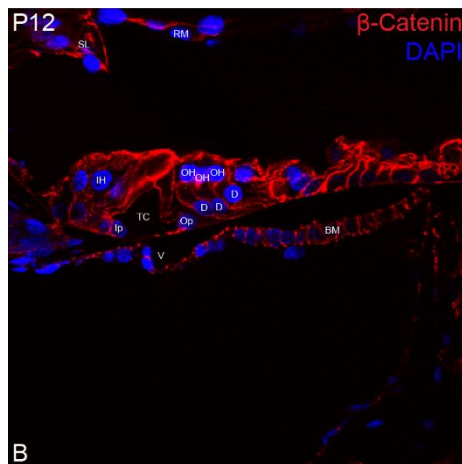
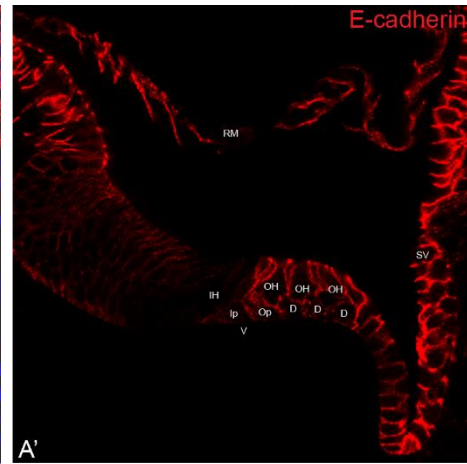
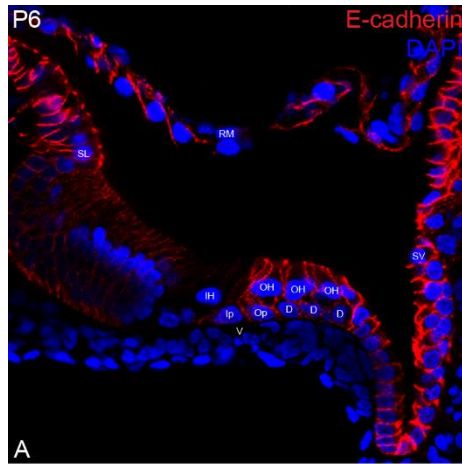
## References

- Arnold W, Anniko M (1990) The cytokeratin skeleton of the human organ of Corti and its functional significance. *Laryngo-rhinotologie* 69(1):24–30
- Bauwens L, Veldman JE, Ramaekers FCS, Bouman H, Huizing EH (1991) Expression of intermediate filament proteins in the adult human cochlea. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 100(3):211–218
- Chen P, Segil N (1999) p27kip1 links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Development* 126:1581–1590
- Colucciguyon E, Portier MM, Dunia I, Paulin D, Pourmin S, Babinet C (1994) Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell* 79(4):679–694
- Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari HM, Goldman RD (2009) Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest* 119(7):1763–1771
- Herrmann H, Strelkov SV, Burkhard P, Aebi U (2009) Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin Invest* 119(7):1772–1783
- Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119(6):1420–1428
- Kelley MW (2006) Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nat Rev Neurosci* 7(11):837–849
- Kelley MW (2007) Cellular commitment and differentiation in the organ of Corti. *Int J Dev Biol* 51(6–7):571–583
- Kelley MW, Driver EC, Puligilla C (2009) Regulation of cell fate and patterning in the developing mammalian cochlea. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 17(5):381–387
- Kim K, Daniels KJ, Hay ED (1998) Tissue-specific expression of beta-catenin in normal mesenchyme and uveal melanomas and its effect on invasiveness. *Exp Cell Res* 245(1):79–90
- Kobayashi Y, Nakamura H, Funahashi JI (2008) Epithelial-mesenchymal transition as a possible mechanism of semicircular canal morphogenesis in chick inner ear. *Tohoku J Exp Med* 215(3):207–217
- Kuijpers W, Peters TA, Tonnaer E, Ramaekers FCS (1991a) Expression of cytokeratin polypeptides during development of the rat inner-ear. *Histochemistry* 96(6):511–521
- Kuijpers W, Tonnaer E, Peters TA, Ramaekers FCS (1991b) Expression of intermediate filament proteins in the mature inner-ear of the rat and guinea-pig. *Hear Res* 52(1):133–146
- Kuijpers W, Tonnaer E, Peters TA, Ramaekers FCS (1992) Developmentally-regulated coexpression of vimentin and cytokeratins in the rat inner-ear. *Hear Res* 62(1):1–10
- Mogensen MM, Henderson CG, Mackle JB, Lane EB, Garrod DR, Tucker JB (1998) Keratin filament deployment and cytoskeletal networking in a sensory epithelium that vibrates during hearing. *Cell Motil Cytoskeleton* 41(2):138–153
- Mu MY, Chardin S, Avan P, Romand R (1997) Ontogenesis of rat cochlea. A quantitative study of the organ of Corti. *Dev Brain Res* 99(1):29–37
- Oesterle EC, Sarthy PV, Rubel EW (1990) Intermediate filaments in the inner ear of normal and experimentally damaged guinea pigs. *Hear Res* 47(1–2):1–16
- Osborn M, Debus E, Weber K (1984) Monoclonal antibodies specific for vimentin. *Eur J Cell Biol* 34(1):137–143
- Ramaekers FCS, Huysmans A, Schaart G, Moesker OPV (1987) 5. Cytoskeletal proteins as markers in surgical pathology. In: Ruiter DJ, Fleuren GF, Warnaar SO (eds) Application of monoclonal antibodies in tumor pathology Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, Boston, pp 65–85
- Riou P, Saffroy R, Chenailler C, Franc B, Gentile C, Rubinstein E, Resink T, Debuire B, Piatier-Tonneau D, Lemoine A (2006) Expression of T-cadherin in tumor cells influences invasive potential of human hepatocellular carcinoma. *Faseb J* 20(13):2291–2301
- Roth B, Bruns V (1992a) Postnatal-development of the rat organ of Corti. 1. General morphology, basilar-membrane, tectorial membrane and border cells. *Anat Embryol* 185(6):559–569
- Roth B, Bruns V (1992b) Postnatal-development of the rat organ of Corti. 2. Hair cell receptors and their supporting elements. *Anat Embryol* 185(6):571–581
- Sakuma H (1998) Regional variations of the cytokeratin expression along the guinea pig cochlear turn. *Nihon Jibiinkoka Gakkai kaiho* 101(11):1348–1357
- Sato M, Leake PA, Hradek GT (1999) Postnatal development of the organ of Corti in cats: a light microscopic morphometric study. *Hear Res* 127(1–2):1–13
- Savagner P (2010) The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Ann oncol Off J Eur Soc Med Oncol/ESMO* 21(Suppl 7):vii89–vii92
- Simonneau L, Gallego M, Pujol R (2003) Comparative expression patterns of T-, N-, E-cadherins, beta-catenin, and polysialic acid neural cell adhesion molecule in rat cochlea during development: Implications for the nature of Kolliker's organ. *J Comp Neurol* 459(2):113–126
- Thelen N, Breuskin I, Malgrange B, Thiry M (2009) Early identification of inner pillar cells during rat cochlear development. *Cell Tissue Res* 337(1):1–14
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139(5):871–890
- Toivola DM, Strnad P, Habtezion A, Omary MB (2010) Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends Cell Biol* 20(2):79–91
- Whitlon DS (1993) E-Cadherin in the mature and developing organ of Corti of the mouse. *J Neurocytol* 22(12):1030–1038
- Wikstrom SO, Anniko M, Thornell LE, Virtanen I (1988) Developmental stage-dependent pattern of inner ear expression of intermediate filaments. *Acta Otolaryngol* 106(1–2):71–80
- Yilmaz M, Christofori G (2009) EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28(1–2):15–33
- Zeisberg M, Neilson EG (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119(6):1429–1437
- Zhang L, Hu Z (2012) Sensory epithelial cells acquire features of prosensory cells via epithelial to mesenchymal transition. *Stem Cells and Development* [Epub ahead of print]



**Fig. S1** Western blots showing the vimentin (lane 1), cytokeratin 8 (lane 2), E-cadherin (lane 3),  $\beta$ -catenin (lane 4), upper panel, and  $\beta$ -actin (lanes 2–4), bottom panel, expression, in freshly isolated cochlea (lane 1), liver (lanes 2 and 3) and lung (lane 4) from rat. The results are in total agreement with previous data (Table S1).

**Fig. S2** Immunolocalization of different cytoskeletal proteins in the basal turn of the cochlear duct. a–a' Only the epithelial cells and not the mesenchymal cells are E-cadherin-positive (red) at P6. b–b' All the epithelial cells are  $\beta$ -catenin-positive (red) at P12. A  $\beta$ -catenin labelling is also observed in the mesenchymal cells of the basilar membrane. c–c' The vimentin labelling (green) is essentially present over the mesenchymal cells at P10. The sensory cells of the Corti organ are specifically detected with an anti-myosin VI antibody (red). d–d' Like E-cadherin, only the epithelial cells are CK8-positive (red) at P0. The cell nuclei are visualised with DAPI staining (blue). D(1–3) Deiters' cells, Ip inner pillar cell, I inner hair cell, O(1–3) outer hair cell, Op outer pillar cell, RM Reissner membrane, SL spiral limbus, SV stria vascularis, TC tunnel of Corti, V spiral vessel. Bar 10  $\mu$ m.



**Table S1. Specifications of different primary antibodies used in the study**

<u>Antibody</u>	<u>Sp.</u>	<u>Clonality</u>	<u>Product No.</u>	<u>Lot number</u>	<u>Original immunogen</u>	<u>Western Blot in rat</u>	<u>Dilution</u>	<u>Manufacturer</u>
Anti-cytokeratin Pan	Ms.	monoclonal	C2562	#060M4859 #039K4825	Mixture of several monoclonal cytoke- ratin clones (clone C- 11+PCK-26+CY-90+KS- 1A3+M20+A53-B/A2)		1:100	Sigma-Aldrich
Anti-cytokeratin 4	Rb.	polyclonal	ab51600	#791954	Synthetic peptide corresponding to residues near the N terminal of human cytoke- ratin 4	Antigen mol wt 57 kDa (1)	1:100	Abcam
Anti-cytokeratin 5	Rb.	polyclonal	ab53121		Synthetic peptide derived from human cytoke- ratin 5	Antigen mol wt 62 kDa (1)	1:100	Abcam
Anti-cytokeratin 7	Ms.	monoclonal	ab9021	#858182	Human Cytoke- ratin 7 bladder carcinoma cell line T24	Antigen mol wt 54 kDa (1)	1:100	Abcam
Anti-cytokeratin 8	Ck.	polyclonal	ab14053	#746248 #Gr6612-4	Recombinant fragment, corresponding to amino acids 391- 483 of Human cytoke- ratin 8	Antigen mol wt 54 kDa (1, see study Fig. S1)	1:100	Abcam
Anti-vimentin	Ms.	monoclonal	V6389	#041M4750	Pig eye lens vimentin	Antigen mol wt ~58 kDa (1, 2, 3, 4, 5, see study Fig. S1)	1:100	Sigma-Aldrich
Anti-E-cadherin	Rb.	polyclonal	ab53033	#746935	Synthetic peptide derived from human E-cadherin	Antigen mol wt 97 kDa (1, 6, see study Fig. S1)	1:100	Abcam
Anti-β-catenin	Rb.	monoclonal	ab32572	#Gr33506-1	Synthetic peptide corresponding to residues near N terminus of human β-catenin	Antigen mol wt 120 kDa (1, 7, see study Fig. S1)	1:100	Abcam
Anti-myosin IV	Rb.	monoclonal	M5187	#079K4839	Synthetic peptide corresponding to amino acids 291-302 of human myosin VI	Antigen mol wt ~150 kDa (1)	1:150	Sigma-Aldrich
Anti-p27 <sup>kip1</sup>	Ms.	monoclonal	P2092	#027K4831	Recombinant rodent p27 <sup>Kip1</sup>	Antigen mol wt 27 kDa (1)	1:100	Sigma-Aldrich

**Table S1** Specifications of different primary antibodies used in the study. (1) Data shown in the manufacturer; (2) Osborn, Debus, et al. 1984; Eur J Cell Biol 34(1): 137–143; (3) Pagan, Sanchez, et al., 1999; Journal of Hepatology; 31: 895–904; (4) Zou, Yaoita, et al., Virchows Archiv : an international journal of pathology 448 (4): 485–492; (5) Harborth, Elbashir, et al., 2001. Journal of Cell Science 114, 4557–4565; (6) Yang, Ju, et al. 2011; J Cell Biochem 112: 2558–2565; (7) Kim, Daniels, et al. 1998; Exp Cell Res 245(1):79–90.

## 10 | Dynamique spatio-temporelle des isotypes de tubuline $\beta$ durant le développement de l'organe de Corti

Comme signalé dans le chapitre consacré aux microtubules (voir 5.3), la localisation des différents isotypes de tubuline varie non seulement en fonction des tissus, mais également selon leur emplacement au sein même des cellules (Ludueña, 2013). Au sein des vertébrés, cette nécessité de posséder différents isotypes de tubuline n'est pas encore très bien comprise. Néanmoins, l'équipe menée par Saillour (2014) a montré chez le rat que l'absence de la tubuline  $\beta 3$  ne pouvait pas être compensée par l'expression d'autres isotypes de tubuline et que cette absence menait à un développement anormal du cerveau. Ces résultats semblent indiquer que malgré leurs nombreuses caractéristiques communes, chaque isotype de tubuline pourrait avoir un rôle qui lui est propre (Saillour *et al.*, 2014).

Afin d'évaluer les différents rôles que pourraient jouer les différents isotypes de tubuline, l'organe de Corti représente un excellent modèle d'étude. Il est en effet constitué par plusieurs types cellulaires et présente une architecture typique. De plus, une des caractéristiques principales exhibée par les cellules de soutien de l'organe de Corti est la présence d'un cytosquelette particulier constitué par un assemblage organisé de plusieurs centaines de microfilaments d'actine et de microtubules (Tolomeo et Holley, 1997; Tucker *et al.*, 1993) (voir 2.2.2.3). D'autre part, l'organe de l'audition est la seule structure connue au sein des mammifères présentant des microtubules à 15 protofilaments au lieu des 13 habituels (Tucker *et al.*, 1992).

Nous avons ainsi observé la répartition de différents isotypes de tubuline  $\beta$  durant le développement de l'organe de Corti chez le rat entre E18 et P25. Nous avons appliqué des méthodes de marquages en immunofluorescence sur des cryosections de cochlées avec plusieurs anticorps anti-tubuline  $\beta$ . Nous avons également réalisé ponctuellement des coupes ultrafines afin de pouvoir observer les échantillons prélevés en microscopie électronique à transmission.

Nos observations des différents isotypes de tubuline  $\beta$  durant le développement de l'organe de Corti montrent une claire évolution dans leur répartition. Au sein des cellules sensorielles, les premiers isotypes que nous mettons en évidence sont la tubuline  $\beta 2$  à partir de E18 et la tubuline  $\beta 4$  à partir de E20. Leur présence décroît petit à petit durant le développement et ces deux isotypes sont absents des cellules sensorielles de l'organe de l'audition mature. Ces résultats sont quelque peu différents de ceux obtenus chez la gerbille par Jensen-Smith et ses collaborateurs (2003). En effet, ces derniers avaient notamment mis en évidence la présence de la tubuline  $\beta 4$  dans les cellules sensorielles externes matures. La même équipe ainsi que celles d'autres auteurs, ont également mis en évidence la tubuline  $\beta 2$  dans les cellules sensorielles matures chez la gerbille et chez le cochon d'Inde (Hallworth et Ludueña, 2000; Jensen-Smith *et al.*, 2003; Steyger *et al.*, 1989); observations que nous ne retrouvons pas chez le rat.

Au sein des cellules de soutien, le premier isotype de tubuline observable est la tubuline  $\beta 2$ , présente dès E18. À partir de E20, nous notons également la présence de la tubuline  $\beta 1$ . À la naissance, nous montrons l'apparition de tubuline  $\beta 4$  dans la partie supérieure de la cellule pilier interne, concordant avec la présence d'un site de nucléation de microtubules au niveau apical de chaque cellule de soutien (Jensen-Smith *et al.*, 2003; Souter *et al.*, 1997; Tucker *et al.*, 1992). Nos observations en microscopie électronique corroborent ces derniers résultats. À P6, juste avant l'ouverture du tunnel de Corti, nous mettons pour la première fois en évidence à ce stade la présence de tubuline  $\beta 5$  au sein des cellules piliers. Dès P8, les tubulines  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 4$  et  $\beta 5$  sont présentes sur toute la hauteur des cellules piliers.

Dans les cellules de Deiters à E20, la localisation de la tubuline  $\beta 1$  se limite à la partie basale des cellules. Ce n'est qu'à partir de P6 que les tubulines  $\beta 1$  et  $\beta 2$  seront observées sur toute la hauteur des cellules de Deiters. D'une façon intéressante, nous notons l'apparition des

tubulines  $\beta 4$  et  $\beta 5$  dans les cellules de Deiters à P8, peu avant l'ouverture des espaces de Nuel. À partir de ce stade, les tubulines  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 4$  et  $\beta 5$  sont présentes sur toute la hauteur des cellules de Deiters. Dans leur partie basale, nous observons également la présence d'une large bande de tubulines  $\beta 2$  et  $\beta 5$ . Ces résultats sont en accord avec une étude réalisée par Slepecky et ses collaborateurs (1995) qui suggéraient la présence de deux faisceaux de microtubules au sein des cellules de Deiters : un premier qui s'étend depuis la base des cellules sensorielles externes jusqu'à la base des cellules de Deiters, et un second qui s'étend de la base des cellules sensorielles externes jusqu'à la lame réticulaire. Nos marquages en immunofluorescence ainsi que nos observations en microscopie électronique à transmission dans un organe de Corti mature démontrent effectivement la présence de deux faisceaux de microtubules distincts présents dans les cellules de Deiters. Nous sommes également les premiers à déterminer avec précision le stade de développement durant lequel ces deux faisceaux se mettent en place.

Nous avons précédemment mis en évidence une période critique durant le développement de l'organe de Corti chez le rat, entre P6 et P8 (Johnen *et al.*, 2012). Durant cette période, l'organe de l'audition subit d'importantes modifications morphologiques et moléculaires. C'est également durant cette période qu'il a été montré que le nombre de microtubules augmentait progressivement pour atteindre son impressionnante quantité observée chez le mammifère adulte (Hallworth *et al.*, 2000; Szarama *et al.*, 2012; Tucker *et al.*, 1992). Nos présents résultats viennent confirmer ces précédentes données. En effet, nous montrons une importante augmentation du marquage de plusieurs isotypes de tubuline  $\beta$  au sein des cellules piliers à partir de P6. Cette augmentation sera également observée peu après dans les cellules de Deiters. La distribution des différents isotypes de tubuline  $\beta$  semble fixée une fois les espaces intercellulaires de l'organe de l'audition ouverts.

C'est également autour de cette période clé que nous observons pour la première fois l'apparition de la tubuline  $\beta 5$ . Cette dernière observation est concomitante à la séparation des faisceaux de microtubules que nos observations réalisées en microscopie électronique à transmission ainsi que l'étude de Tannenbaum et Slepecky (1997) chez la gerbille illustrent. Il est intéressant de noter que, dans des cellules cancéreuses en culture, la sur-expression de la tubuline  $\beta 5$  mène à une désorganisation des faisceaux de microtubules ainsi qu'à leur

détachement du centrosome (Bhattacharya et Cabral, 2004; Bhattacharya *et al.*, 2011). Nous suggérons dès lors que la tubuline  $\beta 5$  pourrait jouer un rôle dans la subdivision des faisceaux de microtubules observée durant le développement de l'organe de Corti. Si cette hypothèse s'avérait exacte, elle tendrait également à montrer que chaque isotype de tubuline posséderait un rôle fonctionnel qui lui est propre.

# Spatio-temporal dynamics of $\beta$ -tubulin isotypes during the development of the sensory auditory organ in rat

Justine Renauld<sup>1</sup> · Nicolas Johnen<sup>1</sup> · Nicolas Thelen<sup>1</sup> · Marie Cloes<sup>1</sup> · Marc Thiry<sup>1</sup>

Accepted: 5 June 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** There are different  $\beta$ -tubulin isoforms in microtubules of vertebrate tissues. However, their functional significance is still largely unknown. In the present study, we investigated the localization of five  $\beta$ -tubulin isotypes ( $\beta$ 1–5) within the hearing organ during development in rat. By using confocal microscopy, we showed that with the exception of the  $\beta$ 3-tubulin isoform that was specific to nerve fibres, all the different  $\beta$ -tubulin isoforms were mainly present in the supporting cells. Contrary to  $\beta$ 1–4-tubulins, we also found that the  $\beta$ 5-tubulin isoform appeared only at a key stage of the post-natal development in specific cell types (pillar cells and Deiters' cells). By using transmission electron microscopy, we revealed further that this developmental stage coincided with the formation of two separate bundles of microtubules from a unique one in these supporting cells. Together, these results suggest that the  $\beta$ 5-tubulin isoform might be involved in the generation of new microtubule bundles from a pre-existing one.

**Keywords** Microtubules · Development · Confocal microscopy · Transmission electron microscopy

Justine Renauld and Nicolas Johnen have contributed equally to this article.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00418-015-1350-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Justine Renauld  
justine.renauld@ulg.ac.be

✉ Marc Thiry  
mthiry@ulg.ac.be

<sup>1</sup> Unit of Cell and Tissue Biology, GIGA-Neurosciences, University of Liege, CHU Sart-Tilman, B36, 4000 Liege, Belgium

## Introduction

Microtubules constitute one of the major components of the cytoskeleton in eukaryotic cells and are involved in many essential processes, including cell division and ciliary and flagellar motility (Etienne-Manneville 2013; Lee and Norden 2013; Akhshi et al. 2014). They are also essential for cell migration and axon development, and are required, along with actin filaments and intermediate filaments, for the dynamic spatial organization of the cytoplasm (Joshi et al. 1985; Tischfield et al. 2010).

Microtubules are long, hollow cylinders of approximately 25 nm in diameter made up of the association of protofilaments that are aligned parallel to the long axis of the tubule. A protofilament is formed by tubulin heterodimers associated in a head-to-tail manner. Heterodimers consist of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin isotypes, each encoded by distinct genes. Seven isotypes of mammalian  $\beta$ -tubulin have been characterized, termed  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4a,  $\beta$ 4b,  $\beta$ 5 and  $\beta$ 6 (Ludueña 1998). With the exception of  $\beta$ 6, the  $\beta$ -tubulin isotypes are among the most highly conserved proteins known (Ludueña 1998).

The strict conservation of isotype-specific amino acid sequences over extensive periods of evolutionary time argues in favour of different functional roles for the different isotypes (Cowan et al. 1988). But the reason why vertebrates express seven different  $\beta$ -tubulin genes is not well understood (Yang et al. 2009).

Recently, some researchers (Hari et al. 2003; Bhattacharya and Cabral 2004; Bhattacharya et al. 2011; Yang et al. 2009) have shown that modulating the expression of some isotypes caused abnormalities in cell growth and altered sensitivity to drugs targeting microtubules.

Although the functional significance of the diversity of the  $\beta$ -tubulin is still unknown (Wade 2009), in 1976,

Fulton and Simpson suggested that the various isoforms of  $\beta$ -tubulin could mediate the different functional roles of microtubules (Fulton and Simpson 1976). As per this hypothesis, the isoforms would be selectively expressed in different tissues and may even be compartmentalized within cells according to their function (Perry et al. 2003). Consistently, it was found that different isoforms were expressed in different cell types of the same tissue (Lewis et al. 1985; Roach et al. 1998; Hallworth and Ludueña 2000). Moreover, it was demonstrated in invertebrates that the small amino acid sequence differences between  $\beta$ -tubulin isoforms were conserved for functional reasons. Genetically modified *Drosophila* testis expressing more than 6 % of a moth  $\beta$ -tubulin isoform exhibited the 16-protofilament structure characteristic of the moth on the corresponding subset of *Drosophila* microtubules, which normally contain only 13-protofilament microtubules (Raff 1997). Another example was the nematode worm *Caenorhabditis elegans* in which all somatic cells have microtubules with 11 protofilaments except mechanosensory neurons of touch possessing microtubules with 15 protofilaments. This structural organization could be lost by the inhibition of *mec-12* ( $\alpha$ -tubulin) and *mec-7* ( $\beta$ -tubulin). The mutational studies indicated clearly that this specific heterodimer was essential in the formation of 15-protofilament microtubules and that this structure was fundamental for the touch sense (Savage et al. 1989; Fukushige et al. 1999; Bounoutas et al. 2009; Wade 2009).

The importance of the different  $\beta$ -tubulin isoforms was less well established in vertebrates. Nevertheless, Saillour and his collaborators (Saillour et al. 2014) revealed recently that the deletion of  $\beta$ 3-tubulin led to some developmental abnormalities in the brain that could not be rescued by any other  $\beta$ -tubulin isoforms. This observation supports the notion that even if they share significant homology and similar functions, each tubulin isoform may have a specific role (Saillour et al. 2014).

The organ of Corti, located within the cochlea, a portion of the inner ear, appears to be an excellent model for studying the role of  $\beta$ -tubulin isoforms. This epithelium is responsible for the transduction of sound waves into nerve impulses and is composed of two cellular types: the sensory cells and the non-sensory supporting cells (Fritzsch et al. 2014). This highly specialized epithelium contains different kinds of supporting cells: the phalangeal cell, the inner and outer pillar cells and Deiters' cells. Pillar and Deiters' cells are characterized by an abundant and highly ordered cytoskeleton framework (Henderson et al. 1995). Moreover, we already know that this tissue contains a particular type of microtubules. In fact, the organ of Corti is the only vertebrate tissue exhibiting microtubules with 15 protofilaments instead of the canonical 13 (Tucker et al. 1992). All these reasons support the choice of the organ of Corti to study the  $\beta$ -tubulin isoforms.

In the present work, we studied the spatio-temporal dynamics of each  $\beta$ -tubulin isoform during the development of the organ of Corti. Jensen-Smith and colleagues (2003) proposed that  $\beta$ -tubulin isoform compositions in the hair cells and pillar cells are the same at birth, before undergoing a selective reduction at late stages in post-natal development (Jensen-Smith et al. 2003). Unlike them, we showed that only some isoforms labelled these cells at early stages. Thus, we revealed for the first time that  $\beta$ 5-tubulin, a tubulin solely detected in adult gerbil cochlea (Banerjee et al. 2008), labelled specific cell types during key stages of the development of the organ of Corti.

## Materials and methods

### Animals

Animal handling was carried out in compliance with the University of Liege Animal Care and Use Committee guidelines that are in accordance with the Declaration of Helsinki. The Wistar rats were bred in our animal facility. The day of coitus was recorded as day 0 (E0), and the day of birth was recorded as post-natal day 0 (P0). Wistar rats were killed from E18 to P25. Seventy-three rats were killed for the immunolabellings (five at E18, five at E20, five at P0, five at P2, six at P4, six at P6, six at P8, five at P10, four at P12, four at P14, five at P16, four at P18, six at P20 and seven at P25) and six for the ultrastructural analyses (four at P4 and two at P25). Watchmaker forceps were used to dissect the cochleae under a stereomicroscope. The cochlear apex was carefully pierced to allow rapid penetration of the fixative.

### Immunohistochemistry

The cochleae were prepared as previously described (Cloes et al. 2013). They were fixed at 4 °C in a solution composed of 2 % formaldehyde in 0.1 M Sørensen's buffer pH 7.4 for 1 h. After several washes at 4 °C in Sørensen's buffer, the cochleae were decalcified at 4 °C in 4 % (w/v) EDTA in Sørensen's buffer as long as necessary. After that, the samples were washed several times in Sørensen's buffer and incubated at 4 °C in 30 % (w/v) sucrose in Sørensen's buffer on a gently rotating platform until full impregnation for cryopreservation. The cochleae were embedded in 7.5 % (w/v) gelatin 15 % (w/v) sucrose in Sørensen's buffer for 15 min at 37 °C. The preparation was finally plunged into an isopentane bath on dry ice for solidification. The cryosections (14  $\mu$ m thick) were obtained by means of a cryostat (Microm HM 560, Prosan).

The cryosections were rinsed in PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 16 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH

7.4) and permeabilized at room temperature in 1 % Triton X-100 PBS for 10 min. After several washes in PBS, the sections were blocked for 30 min at 37 °C with 10 % (v/v) normal goat serum (NGS) in PBS or 10 % NGS-1 % BSA in PBS. Then, the sections were incubated with the primary antibody solution diluted in 5 % NGS-PBS for 30 min at 37 °C or overnight at 4 °C, washed in PBS and incubated for 30 min at 37 °C with the secondary antibody diluted in PBS. After being washed in PBS, the nuclei were stained by incubating the sections with DAPI (1:50,000, 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma, St Louis, USA) at 37 °C for 15 min. Finally, the cryosections were rinsed in PBS and mounted with Citifluor AF1 (Labovirimpex, Brussels, Belgium).

Primary antibodies were diluted in PBS containing 5 % of NGS at the following concentrations: rabbit anti-myosin VI polyclonal antibody (pAb) M5187 (1:150; Sigma, St Louis, USA), mouse anti- $\beta$ 1-tubulin monoclonal antibody (mAb) T7816 (1:100, Sigma, St Louis, USA), mouse anti- $\beta$ 2-tubulin monoclonal antibody (mAb) T8453 (1:100, Sigma, St Louis, USA), mouse anti- $\beta$ 3-tubulin monoclonal antibody (mAb) T5076 (1:100, Sigma, St Louis, USA), mouse anti- $\beta$ 4-tubulin monoclonal antibody (mAb) T7941 (1:100, Sigma, St Louis, USA), mouse anti- $\beta$ 5-tubulin monoclonal antibody (mAb) [1:100, gift from Dr Richard F. Ludueña (Department of Biochemistry, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas)]. The secondary antibodies used were: goat anti-mouse Alexa 488 and goat anti-rabbit Alexa 594 (1:250, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). As a negative control, the primary antibody was omitted. In each case, no labelling was observed.

The mid- and basal turns of the cochlea were taken in consideration. The immunolabellings were examined under an Olympus IX71 confocal microscope. Acquisitions were made by using a  $\times$ 60 objective. The optical sections were analysed with the software FV10-ASW 1.7 Viewer.

### Electron microscopy

The cochleae were prepared as previously described (Thelen et al. 2009). They were fixed for 2 h at room temperature in 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M Sørensen's buffer pH 7.4. After several washes in the same buffer, the samples were post-fixed for 60 min with 2 % osmium tetroxide in Sørensen's buffer, washed in deionized water, dehydrated at room temperature through a graded ethanol series (70, 96 and 100 %) and embedded in Epon for 48 h at 60 °C. Ultrathin sections (70 nm thick) were obtained by means of an ultramicrotome (Reichert Ultracut E) equipped with a diamond knife (Diatome), were mounted on copper grids coated with collodion and were contrasted with uranyl acetate and lead citrate for 15 min each.

The basal turn of the cochlea was taken into consideration. Ultrathin sections were examined under a Jeol JEM-1400 transmission electron microscope at 80 kV and photographed with a 11 MegaPixel bottom-mounted TEM camera system (Quemesa, Olympus). The images were analysed via iTEM software.

## Results

To determine the precise localization of each  $\beta$ -tubulin isotypes during development of the Corti organ, we performed immunofluorescent labellings on cryosections of rat cochleae from E18 to P25 with specific antibodies against each of the five  $\beta$ -tubulin isotypes ( $\beta$ 1– $\beta$ 5). We also used as a benchmark myosin VI, a known marker of the sensory cells.

### $\beta$ 1-Tubulin isotype

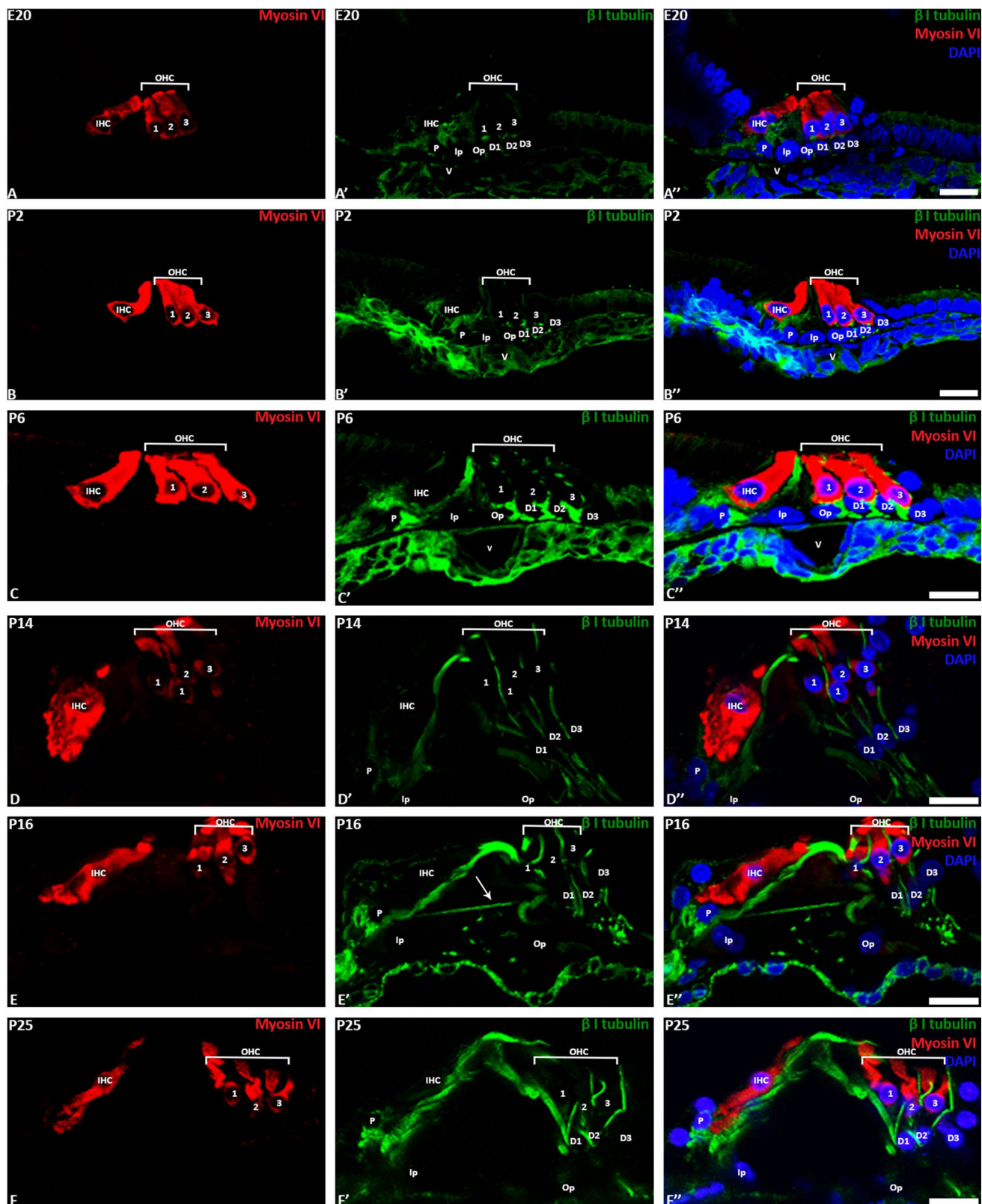
At E20, we detected a weak labelling for  $\beta$ 1-tubulin in the phalangeal cells, in the basal parts of Deiters' cells and in the pillar cells (Fig. 1a). Until P25, no labelling occurred in the sensory cells (Fig. 1a–f). From P2, the fluorescent signal increased in the basal parts of Deiters' cells and in the apex of pillar cells (Fig. 1b). At P6 (Fig. 1c), the labelling became intense at these two locations. At P14, the phalangeal process of Deiters' cells contained  $\beta$ 1-tubulin isotype, but the immunostaining was weaker. From P14 until P25, pillar cells and Deiters' cells displayed an equal and thin labelling along the entire height of cells (Fig. 1d). At P16 (Fig. 1e), we observed the labelling of nerve fibre extensions reaching the outer hair cells (arrow) through the tunnel of Corti.

### $\beta$ 2-Tubulin isotype

During the embryonic stages, a  $\beta$ 2-tubulin isotype labelling was observed in the nerve processes (Fig. 2a), the apex of the inner hair cells and the outer hair cells, with a stronger signal for the third outer hair cells. At birth (Fig. 2b), we also detected an additional labelling in pillar cells and in the basal parts of Deiters' cell. At P6 (Fig. 2c), the labelling started to decrease in the sensory cells. At this stage, the labelling extended to the phalangeal process of Deiters' cells. From P10 to the adult stages (Fig. 2d–f), this isotype was strongly present in the pillar cells and Deiters' cells.

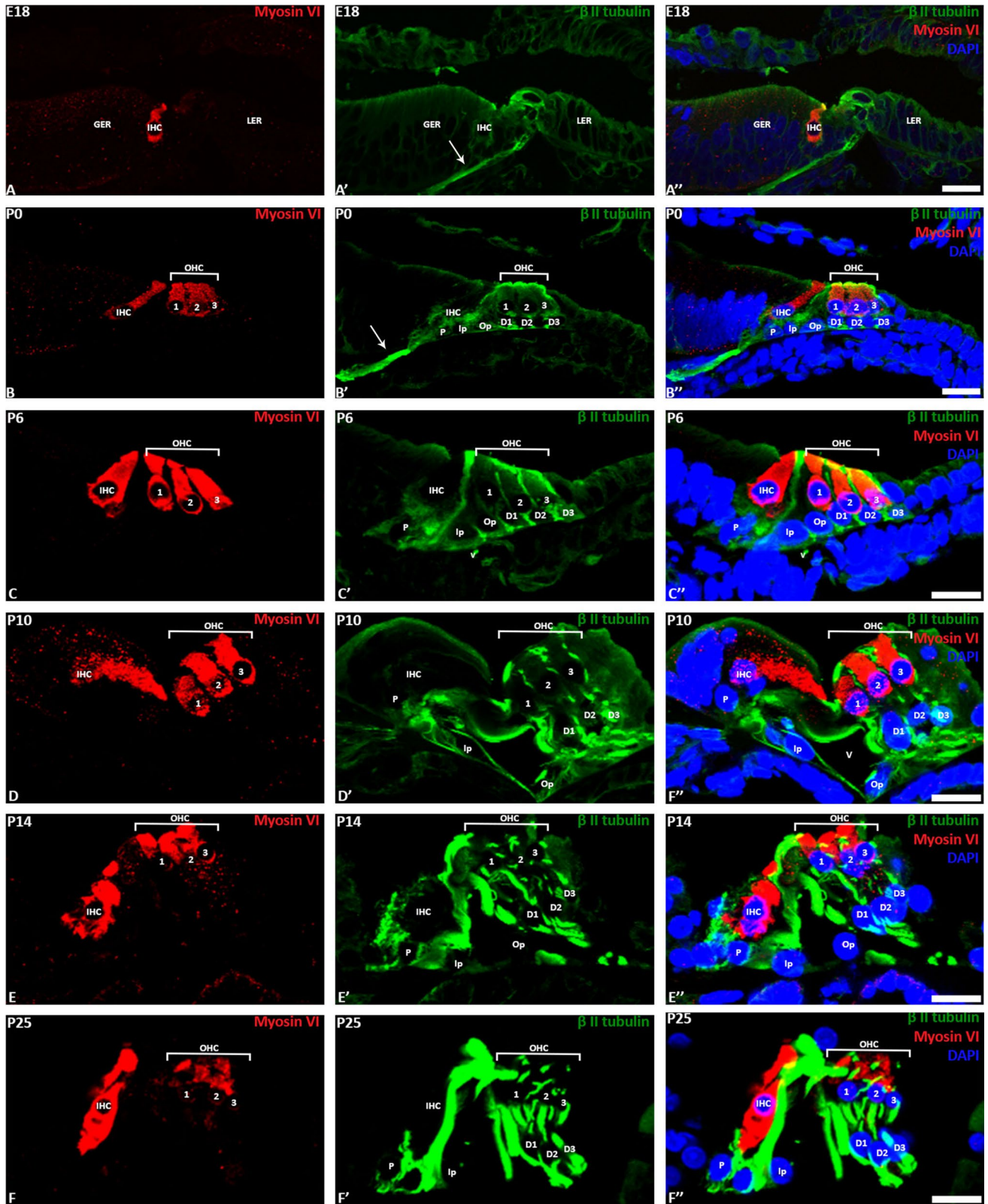
### $\beta$ 3-Tubulin isotype

This isotype is more restricted than the others in the organ of Corti. In fact,  $\beta$ 3-tubulin was only present in the nerve processes emanate from the spiral ganglion (Fig. 3a–f). As



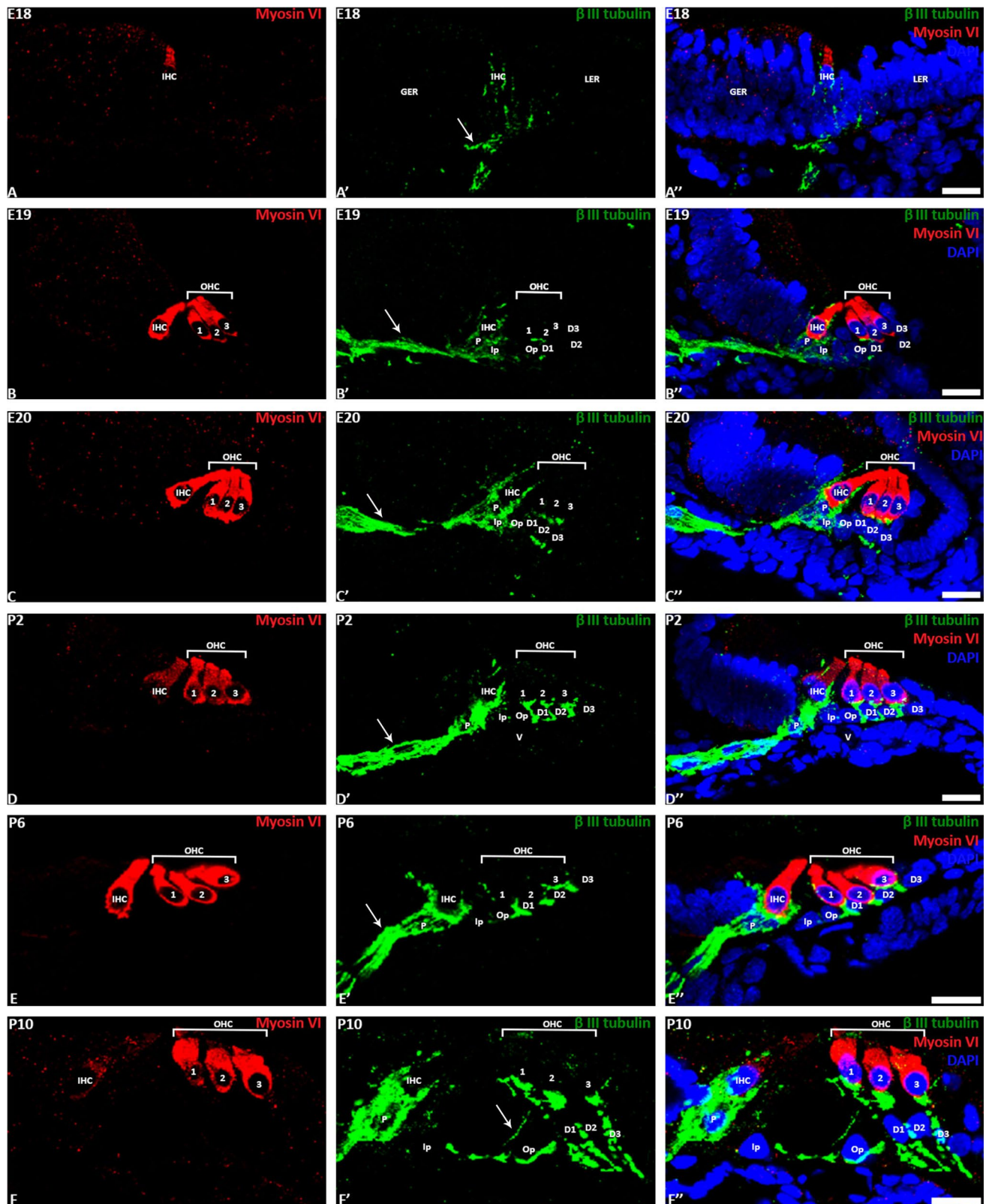
**Fig. 1** Immunolocalization of  $\beta 1$ -tubulin within the organ of Corti from E20 to P25. **a–f** Localization of the hair cells using myosin VI (red). **a'–f'** Immunolocalization of the  $\beta 1$ -tubulin (green). **a'–f''** Merged image with cell nuclei stained with DAPI (blue). *D(1–3)*

Deiters' cells, *Ip* inner pillar cell, *IHC* inner hair cell, *OHC(1–3)* outer hair cell, *Op* outer pillar cell, *P* phalangeal cell, *V* spiral vessel, *arrow* nerve process. *Bar* 20  $\mu\text{m}$



**Fig. 2** Immunolocalization of  $\beta 2$ -tubulin within the organ of Corti from E18 to P25. **a–f** Localization of the hair cells using myosin VI (red). **a'–f'** Immunolocalization of the  $\beta 2$ -tubulin (green). **a''–f''** Merged image with cell nuclei stained with DAPI (blue). *D(1–3)*

Deiters' cells, *Ip* inner pillar cell, *IHC* inner hair cell, *OHC(1–3)* outer hair cell, *Op* outer pillar cell, *P* phalangeal cell, *V* spiral vessel, *arrow* nerve process. *Bar* 20  $\mu\text{m}$



**Fig. 3** Immunolocalization of  $\beta 3$ -tubulin within the organ of Corti from E18 to P10. **a–f** Localization of the hair cells using myosin VI (red). **a'–f'** Immunolocalization of the  $\beta 3$ -tubulin (green). **a''–f''** Merged image with cell nuclei stained with DAPI (blue). *D(1–3)*

Deiters' cells, *Ip* inner pillar cell, *IHC* inner hair cell, *OHC(1–3)* outer hair cell, *Op* outer pillar cell, *P* phalangeal cell, *V* spiral vessel, *arrow* nerve process. *Bar* 20  $\mu\text{m}$

shown in Fig. 3, the  $\beta$ 3-tubulin was present at the embryonic stages (Fig. 3a–c). At E18 (Fig. 3a), a thin labelling was visible around the basal part of the inner hair cells. At E19 (Fig. 3b), the labelling extended to the basal part of the outer hair cells, with extensions stretched in the baso-lateral part of the inner hair cells. From P6 to the adult stage, the  $\beta$ 3-tubulin labelling was detected in the basal parts of each sensory cell, corresponding to the nerve fibres innervating the sensory cells. During the development of the organ of Corti, no labelling was found either in the sensory cells (inner hair cells and outer hair cells) or in the supporting cells (inner pillar cells, outer pillar cells, phalangeal cells and Deiters' cells).

### $\beta$ 4-Tubulin isotype

A  $\beta$ 4-tubulin labelling appeared at E20 in the inner hair cells (Fig. 4a). At this stage, the labelling was intense and spread in the entire height of these cells. At birth, the labelling of inner hair cells seemed to be less strong, and a signal appeared in the inner pillar cells (Fig. 4b). In pillar cells, the labelling is restricted to the apical part. At P4,  $\beta$ 4-tubulin was found in the entire height of the inner pillar cells (Fig. 4c). The signal in the inner hair cells was weak, like in the outer hair cells. At P8 (Fig. 4d), the immunolabelling was also detected in the outer pillar cells and Deiters' cells. P8 was the last developmental stage at which the sensory cells were  $\beta$ 4-tubulin-positive. From this stage, the signal for  $\beta$ 4-tubulin was intense in the supporting cells and remained until the adult stage.

### $\beta$ 5-Tubulin isotype

Unlike other  $\beta$ -tubulin isotypes, the  $\beta$ 5-tubulin was absent from the embryonic stages (Fig. 5a). This isotype appeared for the first time at P6 in the inner pillar cells (Fig. 5b). At P8 (Fig. 5c), the labelling was present in the inner pillar cells and weakly in the outer pillar cells and Deiters' cells. From P10 to the adult stage (Fig. 5d, e), a strong signal was found in the supporting cells (inner pillar cells, outer pillar cells and Deiters' cells), in particular in their basal parts and their phalangeal process.

### Transmission electron microscopy

To determine the precise localization of microtubules within the organ of Corti during development, we analysed rat cochlea at P4 and P25 using transmission electron microscopy.

#### *Deiters' cells*

At P4, the microtubules we observed were all oriented in the same direction, indicating the presence of a single microtubule bundle (arrowheads). However, they were less numerous

and less tight than those observed at P25 (Fig. 6a–c). They were parallel to the longitudinal axis of Deiters' cell. At the adult stage, Deiters' cells were clearly composed of two microtubule bundles (Fig. 6d–g). One bundle went through the phalangeal process of Deiters' cells (Fig. 6e). The other one went under the base of outer hair cells (Fig. 6f). Both bundles gathered together at the level of the cell nucleus and extended to the basilar membrane (Fig. 6g).

#### *Pillar cells*

At P4, we saw a single microtubule bundle starting from the apical part of the cell (Fig S9). In the adult stage, we clearly observed two bundles of microtubules perpendicular to each other (Fig S9 e, f).

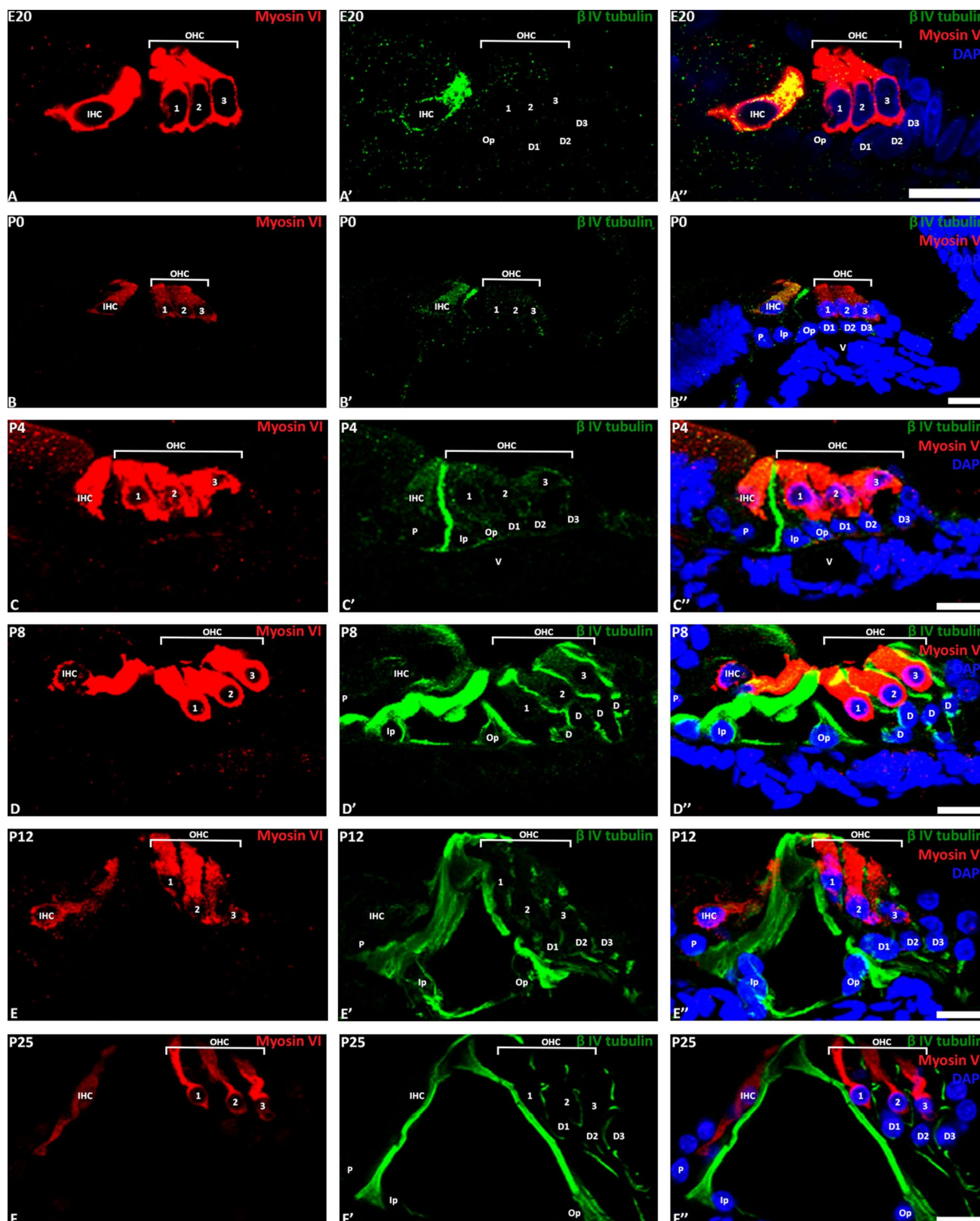
## Discussion

This study is the first description of  $\beta$ -tubulin isotype distribution in the cochlear epithelium of the rat during the development of the organ of Corti from embryonic day E18 to post-natal day P25. Figure 7 shows the distribution of  $\beta$ -tubulin isoforms at two key developmental stages of the organ of Corti: the sixth post-natal day preceding the opening of the tunnel of Corti and the adult stage.

### Localization of $\beta$ -tubulin isotypes in the sensory cells and nerve processes

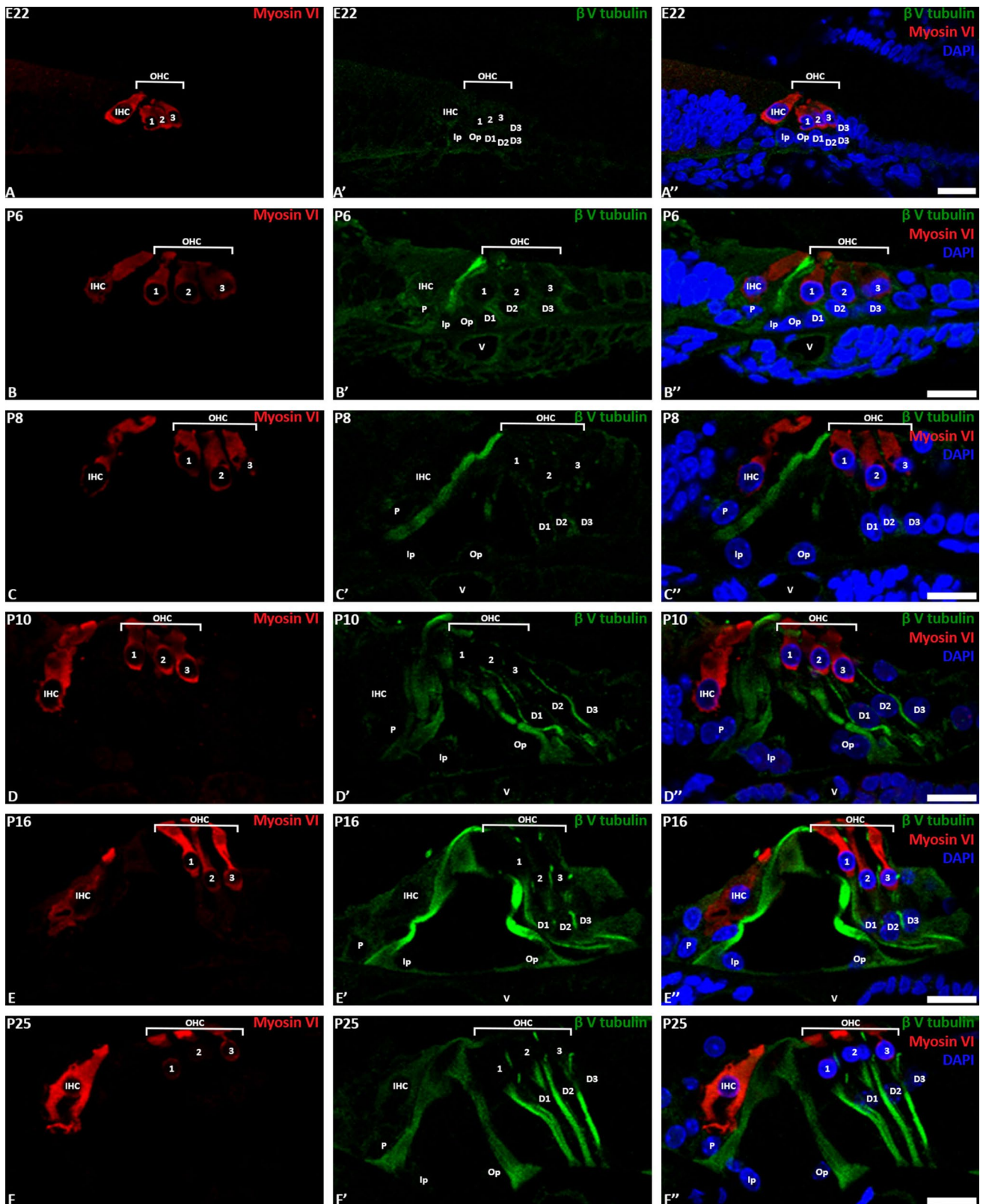
The first  $\beta$ -tubulin isotypes found during the development of the organ of Corti are the  $\beta$ 3-tubulin isotype and the  $\beta$ 2-tubulin isotype at E18. These two isotypes present a distinct localization: the  $\beta$ 3-tubulin is restricted to the nerve processes reaching the inner hair cells, while the  $\beta$ 2-tubulin spreads in the inner hair cells and outer hair cells of organ of Corti in addition to the nerve processes (Fig. 7; Table 1). One day later, the labelling of  $\beta$ 3-tubulin isotype appears in the nerve processes extending to the outer hair cells. At E20, the  $\beta$ 4-tubulin isotype shows an intense labelling in the inner hair cells. This labelling intensity decreases in inner hair cells at birth. These results reveal a difference in the localization of  $\beta$ 4-tubulin isotypes between the gerbil's organ of Corti and the rat's organ of Corti (Jensen-Smith et al. 2003). Moreover, the  $\beta$ 4-tubulin isotype was also detected in the outer hair cells of the adult gerbil's organ of Corti (Jensen-Smith et al. 2003), which was not the case in our study.

The immunolabelling of  $\beta$ 2-tubulin decreased with age and disappeared in the adult rat's sensory cells. Our results differ from those seen by other investigators (Steyger et al. 1989; Hallworth and Ludueña 2000; Jensen-Smith et al. 2003) as we did not observe any labelling of the sensory cells at the adult stages. This discrepancy could be due



**Fig. 4** Immunolocalization of  $\beta 4$ -tubulin within the organ of Corti from E20 to P25. **a–f** Localization of the hair cells using myosin VI (red). **a'–f'** Immunolocalization of the  $\beta 4$ -tubulin (green). **a''–f''** Merged image with cell nuclei stained with DAPI (blue). *D(1–3)*

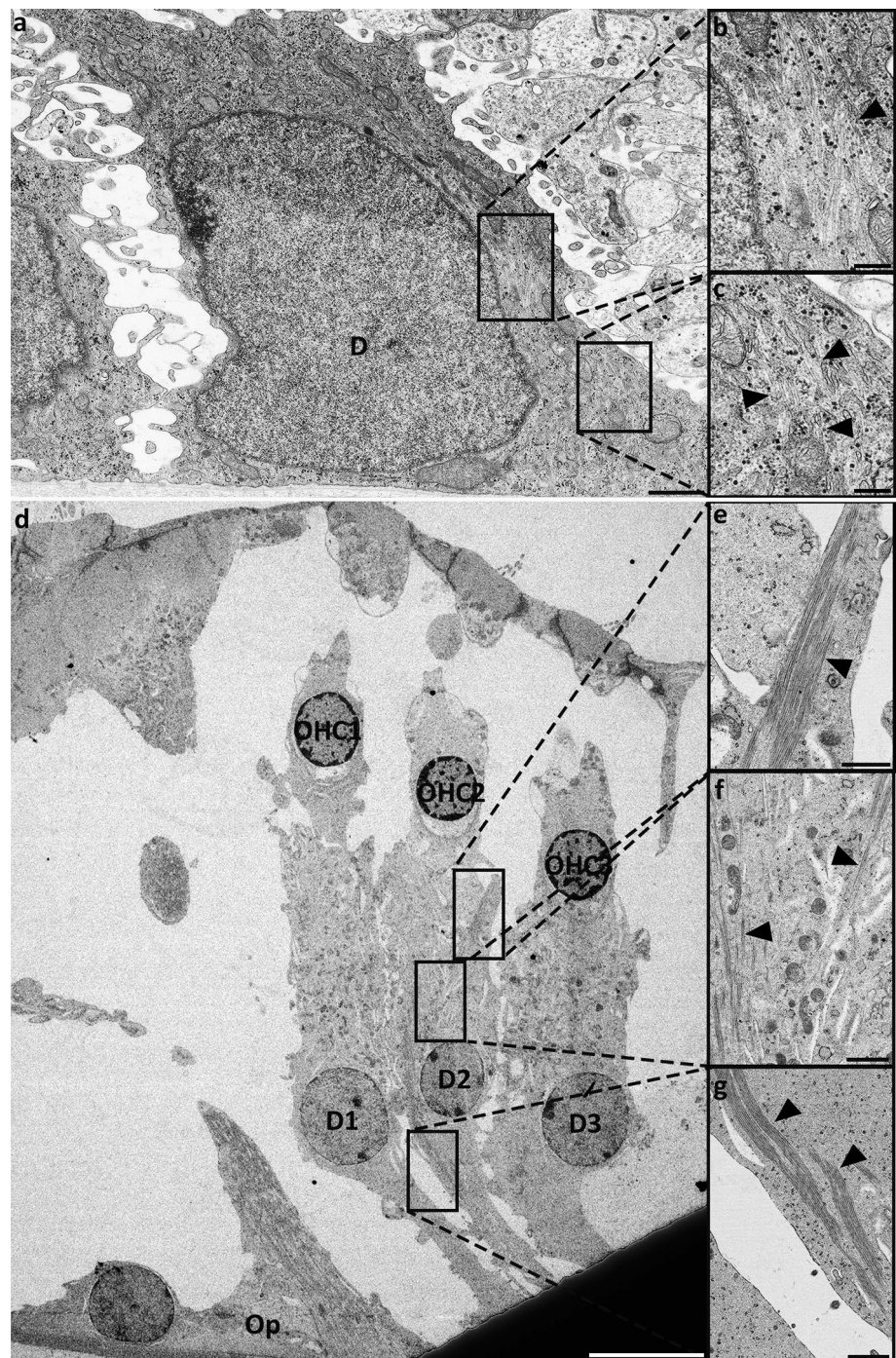
Deiters' cells, *Ip* inner pillar cell, *IHC* inner hair cell, *OHC(1–3)* outer hair cell, *Op* outer pillar cell, *P* phalangeal cell, *V* spiral vessel. Bar 20  $\mu\text{m}$



**Fig. 5** Immunolocalization of  $\beta 5$ -tubulin within the organ of Corti from E22 to P25. **a–f** Localization of the hair cells using myosin VI (red). **a'–f'** Immunolocalization of the  $\beta 5$ -tubulin (green). **a''–f''** Merged image with cell nuclei stained with DAPI (blue). *D(1–3)*

Deiters' cells, *Ip* inner pillar cell, *IHC* inner hair cell, *OHC(1–3)* outer hair cell, *Op* outer pillar cell, *P* phalangeal cell, *V* spiral vessel. Bar 20  $\mu$ m

**Fig. 6** Ultrastructure of Deiters' cells at P4 (**a–c**) and P25 (**d–g**). **a** General view. *Bar* 1  $\mu\text{m}$ . **b**, **c** Details of their cytoplasm containing microtubules (*arrowheads*). *Bar* 250 nm. **d** General view. *Bar* 10  $\mu\text{m}$ . **e** A microtubule bundle of the phalangeal process at high magnification. **f** An enlargement of the two microtubule bundles present in Deiters' cells (*arrowheads*). **g** An enlargement of these two bundles gathered together at the height of the cell nucleus and descending to the basilar membrane (*arrowheads*), *D(1–3)* Deiters' cells, *OHC(1–3)* outer hair cell, *Op* outer pillar cell. *Bar* 250 nm

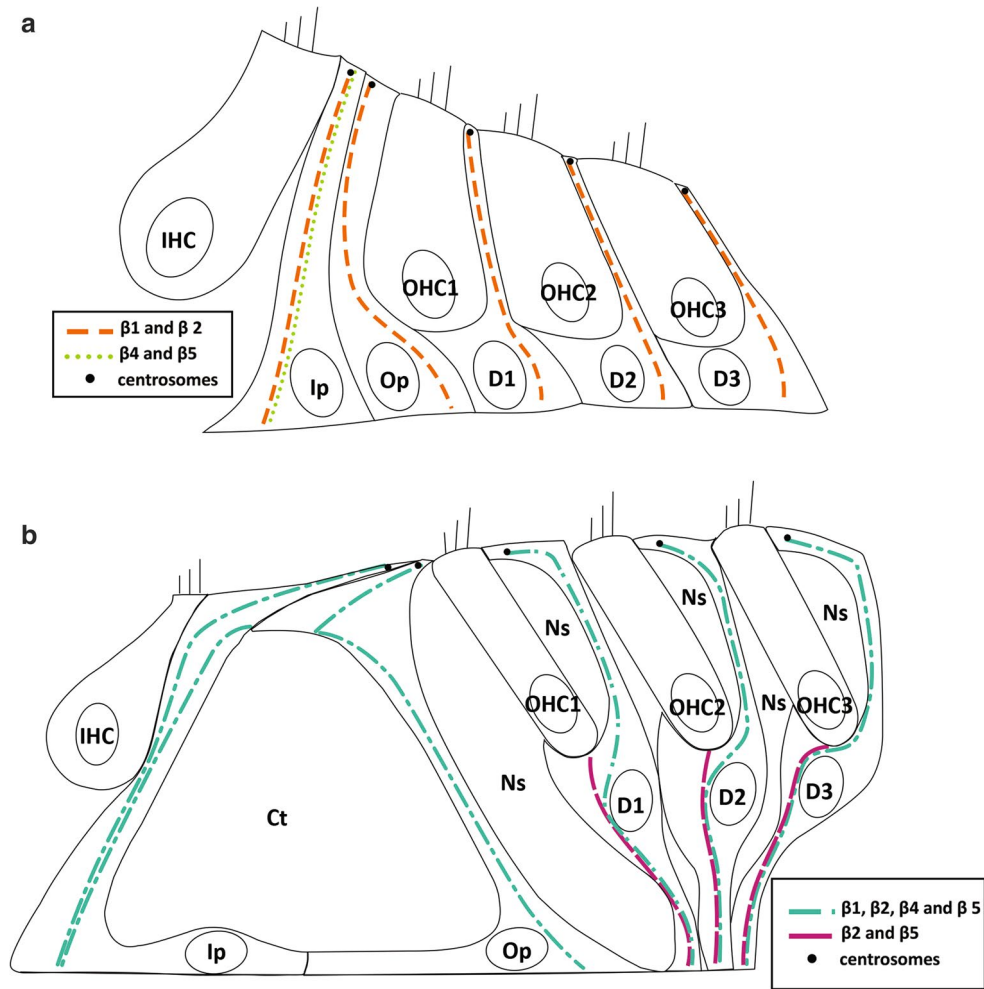


to the antibody used. In fact, we used an antibody targeting amino acids 437–445 at the C-terminal sequence of human  $\beta 2$ -tubulin (EEEEGEDEA), which corresponds to the sequence of  $\beta 2$ -tubulin in the rat. The antibody used in both previous papers targets the C-terminal sequence of the chicken  $\beta 2$ -tubulin (EGEEDEA). It is nevertheless interesting to note that our weak labelling in the sensory cells is in agreement with the small amount of microtubules observed in these cells under electron microscopy (data not shown).

### Localization of $\beta$ -tubulin isotypes in the supporting cells

#### *Pillar cells*

At E18, the  $\beta 2$ -tubulin isotype weakly labelled supporting cells. At E20, the  $\beta 1$ -tubulin isotype was present in all supporting cells of the organ of Corti, along the full length of pillar cells. This localization remained the



**Fig. 7** Schematic diagram of the organ of Corti showing the distribution of  $\beta$ -tubulin isotypes in the supporting cells at P6 (a) and P25 (b). *Ct* tunnel of Corti, *D* Deiters' cells, *Ip* inner pillar cell, *IHC* inner hair cell, *Ns* space of Nuel, *OHC* (1–3) outer hair cell, *Op* outer pillar

cell. Centrosomes are positioned according to data provided by Henderson, Tucker and their teams (Tucker et al. 1992, 1998; Henderson et al. 1994, 1995)

**Table 1** Localization of  $\beta$ -tubulin isotypes observed in each cell type of the organ of Corti during the development (E18–P25) in rat

	E18 → E22	P0	P2 → P4	P6	P8	P10 → P25
Nerves process	$\beta 2$ – $\beta 3$	$\beta 2$ – $\beta 3$	$\beta 3$	$\beta 3$	$\beta 3$	$\beta 3$
Inner hair cells	$\beta 2$ – $\beta 4$	$\beta 2$ – $\beta 4$	$\beta 2$ – $\beta 4$	$\beta 2$ – $\beta 4$	$\beta 2$ – $\beta 4$	
Outer hair cells	$\beta 2$	$\beta 2$	$\beta 2$ – $\beta 4$	$\beta 2$ – $\beta 4$	$\beta 4$	
Inner pillar cells	$\beta 1$	$\beta 1$ – $\beta 4$	$\beta 1$ – $\beta 4$	$\beta 1$ – $\beta 2$ – $\beta 4$ – $\beta 5$	$\beta 1$ – $\beta 2$ – $\beta 4$ – $\beta 5$	$\beta 1$ – $\beta 2$ – $\beta 4$ – $\beta 5$
Outer pillar cells	$\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 1$ – $\beta 2$	$\beta 1$ – $\beta 2$ – $\beta 4$ – $\beta 5$	$\beta 1$ – $\beta 2$ – $\beta 4$ – $\beta 5$
Deiters' cells	$\beta 1$	$\beta 1$ – $\beta 2$	$\beta 1$ – $\beta 2$	$\beta 1$ – $\beta 2$	$\beta 1$ – $\beta 2$ – $\beta 4$ – $\beta 5$ / $\beta 2$ – $\beta 4$	$\beta 1$ – $\beta 2$ – $\beta 4$ – $\beta 5$ / $\beta 2$ – $\beta 4$

same at birth as at E20, which was in agreement with the results obtained in the gerbil (Jensen-Smith et al. 2003). Our results also showed the appearance, at birth, of this  $\beta 4$ -tubulin isotype in the upper part of the inner pillar cell. The labelling in the upper part of the pillar cell was consistent with the finding that inner pillar assembly begins

with the nucleation of a large microtubule population at the apical end of each cell (Tucker et al. 1992; Souter et al. 1997; Jensen-Smith et al. 2003). These results were also in agreement with our electron microscopy analysis of pillar cells at P4 (Fig S9). At P6,  $\beta 2$ -tubulin kept the same localization, while increasing the labelling in

the supporting cells. The  $\beta 4$ -tubulin was found along the entire height of the inner pillar cells.

At this stage, we saw for the first time the appearance of  $\beta 5$ -tubulin, another tubulin isotype never studied during the development of the organ of Corti until now (Fig. 7; Table 1). This tubulin appeared in the inner pillar cell and in the apex of the outer pillar cell. At P8, during the opening of the tunnel of Corti, the  $\beta 4$  and  $\beta 5$ -tubulin isotypes extended their localization to the entire height of the outer pillar cell. From P8 to the adult stage,  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ -,  $\beta 4$ - and  $\beta 5$ -tubulin isotypes were present in pillar cells (Fig. 7; Table 1).

#### *Deiters' cells*

At E18, the  $\beta 2$ -tubulin isotype weakly labelled the supporting cells. At E20, the  $\beta 1$ -tubulin isotype appeared in all the supporting cells of the organ of Corti, along with the basal part of Deiters' cells only, between the base of the outer hair cells and the basilar membrane. At birth, the labelling of this basal part of Deiters' cells was clearly visible with the  $\beta 2$ -tubulin isotype. At P6, these tubulin isotype labellings extended to the phalangeal process of Deiters' cells. At this stage, the basal part of Deiters' cells contained a wide band of  $\beta 1$ - and  $\beta 2$ -tubulin isotypes (Fig. 7; Table 1). At P8, just before the opening of the spaces of Nuel, the  $\beta 4$ - and  $\beta 5$ -tubulin isotypes extended their localization to Deiters' cells (Fig. 7; Table 1). From P8 to the adult stage, except  $\beta 3$ , all  $\beta$ -tubulin isoforms are present along the entire height of Deiters' cells with a wide band composed of  $\beta 2$ - and  $\beta 5$ -tubulin in the basal part (Fig. 7; Table 1).

In Fig. 3f, we observed a labelling for  $\beta 3$ -tubulin in the basal part of Deiters' cells, between the base of the outer hair cells and the reticular lamina.  $\beta 3$ -Tubulin is a well-known neuronal marker (Locher et al. 2013). This labelling can be related to nerve processes which cross the tunnel of Corti and reach the basal part of the outer hair cells, although we visualized some labelling under the nucleus of Deiters' cells. Some researchers had already shown the presence of nerve processes in the basal part of Deiters' cells (Parsa et al. 2012). They said that Deiters' cells showed, in their medial region, a distinctive envelopment of unmyelinated afferent nerves that were thought not to establish any synapse with them, so that our labelling could be explained by these afferent nerves.

Regarding the supporting cells, we clearly see that the localization of the different  $\beta$ -tubulins changes between P6 and P8 (Table 1). We have already shown that during this critical period, pillar and Deiters' cells undergo dramatic morphological and molecular changes (Johnen et al. 2012). It has also been demonstrated that during these stages, microtubules progressively develop to reach the large number found at the adult stage (Tucker et al. 1998; Hallworth

et al. 2000; Szarama et al. 2012). In the present paper, we report a huge increase in the labelling of pillar cells for all  $\beta$ -tubulin isotypes at P6, confirming these previous data. The most drastic change appeared in Deiters' cells, where the labelling increases in length and intensity. This labelling stretches out in the basal part due to the pull up of the cell nucleus. After the opening of the fluid spaces (i.e. the tunnel of Corti and the space of Nuel), the distribution of  $\beta$ -tubulin isotypes did not seem to progress as much as before. In the adult organ of Corti, we can easily conclude that  $\beta$ -tubulin isotypes are mostly present in the supporting cells. This result is in complete agreement with our electron microscopy data in which we show a large amount of microtubules in the supporting cells (Fig. 6).

Supporting cells undergo shape changes during post-natal development, after the differentiation of sensory cells. These shape changes allow the opening of the tunnel of Corti and spaces of Nuel, and appear before the establishment of hearing function. Several authors have shown the importance of intercellular spaces present within the organ of Corti (Karavitaki and Mountain 2007; Zagadou and Mountain 2012). They state that these fluid-filled spaces (tunnel of Corti and spaces of Nuel) facilitate the sound wave that supports OHC amplification. The establishment of microtubule bundles probably plays a significant role in maintaining this epithelial structure. Indeed, rigidity of these supporting cells must exist to allow the opening of such intercellular spaces without the collapse of the entire epithelium. The onset or upregulation of the expression of  $\beta$ -tubulin is probably related to the increase in microtubules present in these cells.

Using immunostaining, Slepecky and her collaborators (1995) suggested the presence of two different microtubule bundles in Deiters' cells: one spanning the distance between the base of the outer hair cells and the basilar membrane and another one between the base of the outer hair cells and reticular lamina (Slepecky et al. 1995). Here, our immunolabellings are consistent with the presence of two distinct microtubule bundles. A narrow one going from phalangeal processes to the nuclear region, labelled by  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ -,  $\beta 4$ - and  $\beta 5$ -tubulin isotypes and a wide one going from the nucleus to the reticular lamina, labelled by the  $\beta 2$ - and  $\beta 5$ -tubulin isotypes. Our immunocytological results are in agreement with our electron microscopic observations. Indeed, we clearly visualized two microtubule bundles in Deiters' cells of an adult cochlea in longitudinal section. These results are consistent with the observations realized in gerbil (Henderson et al. 1995).

Another interesting result obtained in this study is the fact that the  $\beta 5$ -tubulin appeared in a key stage of the development of the organ of Corti. Contrary to the other  $\beta$ -tubulin isoforms, this isotype appears in pillar cells just before the opening of the tunnel of Corti, and in Deiters'

cells before the opening of Nuel's spaces. As shown with our electron microscopic analysis in the supporting cells, this period was characterized by the subdivision of one single microtubule bundle into two separated bundles. Furthermore, Tannenbaum and Slepecky (1997) has shown that these bundles formed by a large number of shorter microtubules (2000 out of the 3000 present in each inner pillar cell) are released from their apical anchoring site and migrate to the base of the cell, where their ends are captured at a basal anchoring site (Tannenbaum and Slepecky 1997).

Together, these data allow us to speculate that the  $\beta 5$ -tubulin isotype might be a particular  $\beta$ -tubulin involved in the detachment of microtubules from the bundle associated with the centrosome in pillar and Deiters' cells. In this context, it is interesting to remember that in cancerous cells, the overexpression of  $\beta 5$ -tubulin disrupts microtubule organization and induces microtubule detachment from the centrosome (Bhattacharya and Cabral 2004; Bhattacharya et al. 2011). If our suggestion proves correct, it will support the multi-tubulin hypothesis which states that each isotype of tubulin mediates the different functional roles of microtubules (Fulton and Simpson 1976; Wade 2009).

**Acknowledgments** We thank Mrs P. Piscicelli for her skilful technical assistance and Dr. Richard F. Ludueña (Department of Biochemistry, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas) for generous gift of the antibody anti- $\beta 5$ -tubulin. We thank the GIGA-Imaging and Flow Cytometry platform for technical support. This work was supported by Fonds de la recherche scientifique (FNRS-FRS). J.R. and N.J. are PhD grant holders of the FRIA. M.C. was a FRS-FNRS Research Fellow.

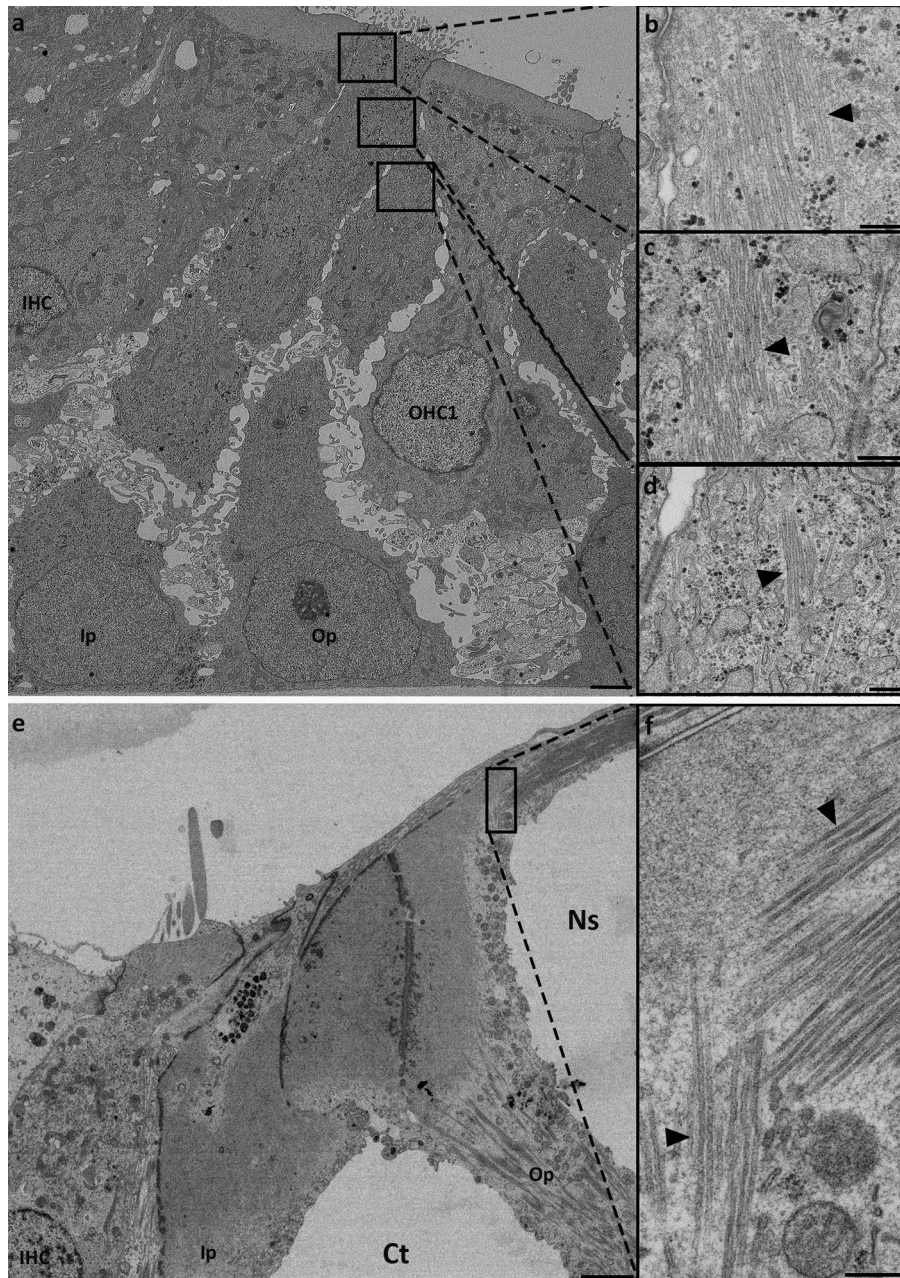
#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Akhshi TK, Wernike D, Piekny A (2014) Microtubules and actin crosstalk in cell migration and division. *Cytoskeleton* 71:1–23. doi:10.1002/cm.21150
- Banerjee A, Jensen-Smith H, Lazzell A et al (2008) Localization of  $\beta v$  tubulin in the cochlea and cultured cells with a novel monoclonal antibody. *Cell Motil Cytoskeleton* 65:505–514. doi:10.1002/cm.20280
- Bhattacharya R, Cabral F (2004) A ubiquitous beta-tubulin disrupts microtubule assembly and inhibits cell proliferation. *Mol Biol Cell* 15:3123–3131. doi:10.1091/mbc.E04
- Bhattacharya R, Yang H, Cabral F (2011) Class V  $\beta$ -tubulin alters dynamic instability and stimulates microtubule detachment from centrosomes. *Mol Biol Cell* 22:1025–1034. doi:10.1091/mbc.E10-10-0822
- Bounoutas A, Hagan RO, Chalfie M (2009) The multipurpose 15-protofilament microtubules in *C. elegans* have specific roles in mechanosensation. *Curr Biol* 19:1362–1367. doi:10.1016/j.cub.2009.06.036
- Cloes M, Renson T, Johnen N et al (2013) Differentiation of Boettcher's cells during postnatal development of rat cochlea. *Cell Tissue Res* 354:707–716. doi:10.1007/s00441-013-1705-8
- Cowan NJ, Lewis SA, Gu W, Burgoyne RD (1988) Tubulin isotypes and their interaction with microtubule associated proteins. *Protoplasma* 145:106–111. doi:10.1007/BF01349346
- Etienne-Manneville S (2013) Microtubules in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29:471–499. doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155711
- Fritzscht B, Pan N, Jahan I, Elliott KL (2014) Inner ear development: building a spiral ganglion and an organ of Corti out of unspecified ectoderm. *Cell Tissue Res*. doi:10.1007/s00441-014-2031-5
- Fukushige T, Siddiqui ZK, Chou M et al (1999) MEC-12, an alpha-tubulin required for touch sensitivity in *C. elegans*. *J Cell Sci* 112(Pt 3):395–403
- Fulton C, Simpson PA (1976) Selective synthesis and utilization of flagellar tubulin. The multi-tubulin hypothesis. *Cell Motil* 3:987–1005
- Hallworth R, Ludueña RF (2000) Differential expression of beta tubulin isotypes in the adult gerbil cochlea. *Hear Res* 148:161–172. doi:10.1016/S0378-5955(00)00149-0
- Hallworth R, McCoy M, Polan-Curtain J (2000) Tubulin expression in the developing and adult gerbil organ of Corti. *Hear Res* 139:31–41. doi:10.1016/S0378-5955(99)00165-3
- Hari M, Wang Y, Veeraraghavan S, Cabral F (2003) Mutations in alpha- and beta-tubulin that stabilize microtubules and confer resistance to colcemid and vinblastine. *Mol Cancer Ther* 2:597–605
- Henderson CG, Tucker JB, Chaplin MA et al (1994) Reorganization of the centrosome and associated microtubules during the morphogenesis of a mouse cochlear epithelial cell. *J Cell Sci* 107(Pt 2):589–600
- Henderson CG, Tucker JB, Mogensen MM et al (1995) Three microtubule-organizing centres collaborate in a mouse cochlear epithelial cell during supracellularly coordinated control of microtubule positioning. *J Cell Sci* 108(Pt 1):37–50
- Jensen-Smith HC, Eley J, Steyger PS et al (2003) Cell type-specific reduction of  $\beta$  tubulin isotypes synthesized in the developing gerbil organ of Corti. *J Neurocytol* 32:185–197. doi:10.1023/B:NEUR.0000005602.18713.02
- Johnen N, Francart M-E, Thelen N et al (2012) Evidence for a partial epithelial-mesenchymal transition in postnatal stages of rat auditory organ morphogenesis. *Histochem Cell Biol* 138:477–488. doi:10.1007/s00418-012-0969-5
- Joshi HC, Chu D, Buxbaum RE, Heidemann SR (1985) Tension and compression in the cytoskeleton of PC 12 neurites. *J Cell Biol* 101:697–705. doi:10.1083/jcb.101.3.697
- Karavitaki KD, Mountain DC (2007) Evidence for outer hair cell driven oscillatory fluid flow in the tunnel of Corti. *Biophys J* 92:3284–3293. doi:10.1529/biophysj.106.084087
- Lee HO, Norden C (2013) Mechanisms controlling arrangements and movements of nuclei in pseudostratified epithelia. *Trends Cell Biol* 23:141–150. doi:10.1016/j.tcb.2012.11.001
- Lewis SA, Lee MG, Cowan NJ (1985) Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *J Cell Biol* 101:852–861. doi:10.1083/jcb.101.3.852
- Locher H, Frijns JHM, Huisman MA, de Sousa Lopes SMC (2013) TUBB3: neuronal marker or melanocyte mimic? *Cell Transplant*. doi:10.3727/096368913X674099
- Ludueña RF (1998) Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol* 178:207–275. doi:10.1016/S0074-7696(08)62138-5
- Parsa A, Webster P, Kalinec F (2012) Deiters cells tread a narrow path—the Deiters cells-basilar membrane junction. *Hear Res* 290:13–20. doi:10.1016/j.heares.2012.05.006
- Perry B, Jensen-Smith HC, Ludueña RF, Hallworth R (2003) Selective expression of beta tubulin isotypes in gerbil vestibular sensory epithelia and neurons. *J Assoc Res Otolaryngol* 4:329–338. doi:10.1007/s10162-002-2048-4

- Raff EC (1997) Microtubule architecture specified by a beta-tubulin isoform. *Science* 275:70–73. doi:[10.1126/science.275.5296.70](https://doi.org/10.1126/science.275.5296.70)
- Roach MC, Boucher VL, Walss C et al (1998) Preparation of a monoclonal antibody specific for the class I isotype of  $\beta$ -tubulin: the  $\beta$  isoforms of tubulin differ in their cellular distributions within human tissues. *Cell Motil Cytoskelet* 39:273–285. doi:[10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1998\)39:4<273:AID-CM3>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1998)39:4<273:AID-CM3>3.0.CO;2-4)
- Saillour Y, Broix L, Bruel-Jungerman E et al (2014) Beta tubulin isoforms are not interchangeable for rescuing impaired radial migration due to *Tubb3* knockdown. *Hum Mol Genet* 23:1516–1526. doi:[10.1093/hmg/ddt538](https://doi.org/10.1093/hmg/ddt538)
- Savage C, Hamelin M, Culotti JG et al (1989) *mec-7* is a beta-tubulin gene required for the production of 15-protofilament microtubules in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 3:870–881. doi:[10.1101/gad.3.6.870](https://doi.org/10.1101/gad.3.6.870)
- Slepecky NB, Henderson CG, Saha S (1995) Post-translational modifications of tubulin suggest that dynamic microtubules are present in sensory cells and stable microtubules are present in supporting cells of the mammalian cochlea. *Hear Res* 91:136–147. doi:[10.1016/0378-5955\(95\)00184-0](https://doi.org/10.1016/0378-5955(95)00184-0)
- Souter M, Nevill G, Forge A (1997) Postnatal maturation of the organ of Corti in gerbils: morphology and physiological responses. *J Comp Neurol* 386:635–651. doi:[10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19971006\)386:4<635::AID-CNE9>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19971006)386:4<635::AID-CNE9>3.0.CO;2-3)
- Steyger PS, Furness DN, Hackney CM, Richardson GP (1989) Tubulin and microtubules in cochlear hair cells: comparative immunocytochemistry and ultrastructure. *Hear Res* 42:1–16. doi:[10.1016/0378-5955\(89\)90113-5](https://doi.org/10.1016/0378-5955(89)90113-5)
- Szarama KB, Gavara N, Petralia RS et al (2012) Cytoskeletal changes in actin and microtubules underlie the developing surface mechanical properties of sensory and supporting cells in the mouse cochlea. *Development* (Cambridge, England) 139:2187–2197. doi:[10.1242/dev.073734](https://doi.org/10.1242/dev.073734)
- Tannenbaum J, Slepecky NB (1997) Localization of microtubules containing posttranslationally modified tubulin in cochlear epithelial cells during development. *Cell Motil Cytoskelet* 38:146–162. doi:[10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1997\)38:2<146::AID-CM4>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1997)38:2<146::AID-CM4>3.0.CO;2-5)
- Thelen N, Breuskin I, Malgrange B, Thiry M (2009) Early identification of inner pillar cells during rat cochlear development. *Cell Tissue Res* 337:1–14. doi:[10.1007/s00441-009-0810-1](https://doi.org/10.1007/s00441-009-0810-1)
- Tischfield MA, Baris HN, Wu C et al (2010) Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. *Cell* 140:74–87. doi:[10.1016/j.cell.2009.12.011](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.011)
- Tucker JB, Paton CC, Richardson GP et al (1992) A cell surface-associated centrosomal layer of microtubule-organizing material in the inner pillar cell of the mouse cochlea. *J Cell Sci* 102(Pt 2):215–226
- Tucker JB, Mogensen MM, Henderson CG et al (1998) Nucleation and capture of large cell surface-associated microtubule arrays that are not located near centrosomes in certain cochlear epithelial cells. *J Anat* 192(Pt 1):119–130. doi:[10.1046/j.1469-7580.1998.19210119.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1998.19210119.x)
- Wade RH (2009) On and around microtubules: an overview. *Mol Biotechnol* 43:177–191. doi:[10.1007/s12033-009-9193-5](https://doi.org/10.1007/s12033-009-9193-5)
- Yang H, Cabral F, Bhattacharya R (2009) Tubulin isotype specificity and identification of the epitope for antibody Tub 2.1. *Protein Eng Des Sel* 22:625–629. doi:[10.1093/protein/gzp046](https://doi.org/10.1093/protein/gzp046)
- Zagadou BF, Mountain DC (2012) Analysis of the cochlear amplifier fluid pump hypothesis. *J Assoc Res Otolaryngol* 13:185–197. doi:[10.1007/s10162-011-0308-x](https://doi.org/10.1007/s10162-011-0308-x)



**Fig S9.** Ultrastructure of Pillar's cells at P4 (a-d) and P25 (e-f). (a) General view. Bar 2.5  $\mu\text{m}$ . (b, c, d) Details of their cytoplasm with microtubule bundles starting from the apical part of the cell (arrowheads). Bar 250 nm. (e) General view. Bar 2.5  $\mu\text{m}$  (f) An enlargement of two microtubule bundles arranged in two different directions (arrowheads). Ct tunnel of Corti Ip inner pillar cell, IHC inner hair cell, Ns space of Nuel, OHC outer hair cell, Op outer pillar cell. Bar 250 nm.



# 11 | Formation des microtubules à 15 protofilaments durant le développement de la cochlée malgré l'absence d'acétylation de la tubuline

Une des caractéristiques notables des cellules de soutien de l'organe de Corti est la présence d'un important cytosquelette composé par des microtubules à 15 protofilaments au lieu des 13 habituels, fait unique chez les mammifères (Kikuchi *et al.*, 1991; Tucker *et al.*, 1992). Des études réalisées chez le vers nématode *Caenorhabditis elegans* suggèrent que cette configuration particulière, observée dans les neurones mécanosensoriels de l'animal, conférerait à ces larges faisceaux de microtubules une meilleure stabilité par rapport à celle observée dans les microtubules des autres cellules de l'organisme (Chalfie et Thomson, 1982; Topalidou *et al.*, 2012). D'autre part, il a été montré qu'il existait chez les invertébrés, une corrélation entre les isotopes de tubuline, leurs modifications post-traductionnelles et le nombre de protofilaments qui composent les microtubules (Cueva *et al.*, 2012; Savage *et al.*, 1989; Ti *et al.*, 2018). Il a été notamment démontré qu'au sein des cellules de la lignée spermatique de la drosophile, l'expression de la tubuline  $\beta 2$  menait à la constitution de microtubules à 16 protofilaments au lieu des 13 habituellement présents dans l'axonème des spermatozoïdes (Raff, 1997). De plus, chez *C. elegans*, l'acétylation des tubulines, une

modification post-traductionnelle, est impliquée dans la formation des microtubules à 15 protofilaments des neurones mécanosensoriels (Cueva *et al.*, 2012; Topalidou *et al.*, 2012).

Si la corrélation entre les isotypes de tubuline, leurs modifications post-traductionnelles et le nombre de protofilaments qui composent les microtubules est relativement bien documentée chez les invertébrés, il n'y a que très peu d'études du genre qui ont été réalisées chez les vertébrés. Dans le présent travail, nous avons analysé la structure des microtubules de la cellule pilier interne de l'organe de Corti chez la souris. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la période post-natale, entre P0 et P25, période critique de la maturation et de la mise en fonction de l'organe sensoriel.

Nous avons ainsi appliqué des méthodes cytochimiques de mordantage à l'acide tannique sur notre matériel afin de pouvoir observer les protofilaments des microtubules en microscopie électronique à transmission. Nous sommes ainsi les premiers à démontrer qu'au sein des cellules piliers internes, le nombre de protofilaments qui composent les microtubules passe de 13 à 15 durant le développement, aux alentours de P4. Nous montrons également l'existence de ce qui semble être un bref état transitoire à 14 protofilaments. Chez la souris, cette période correspond également à l'apparition de la tubuline  $\beta 5$  dans l'organe de Corti.

Chez *C. elegans*, l'acétylation de la tubuline  $\alpha$  joue un rôle prépondérant dans la constitution et le maintien des microtubules à 15 protofilaments (Cueva *et al.*, 2012; Topalidou *et al.*, 2012). Il a été par la suite suggéré que l'acétylation de la tubuline  $\alpha$  modifiait les interactions latérales entre les différents monomères de tubuline  $\alpha$ , favorisant la constitution de microtubules à 15 protofilaments (Cueva *et al.*, 2012). Néanmoins, sur notre matériel murin, nos observations ne vont pas dans le même sens. En effet, même si nos marquages en immunofluorescence de la tubuline- $\alpha$  acétylée illustrent bien sa présence au sein des cellules de soutien, son absence dans une souris invalidée pour ATAT1 ne semble pas modifier le nombre de protofilaments des microtubules qui composent le cytosquelette de la cellule pilier interne. En revanche, il est intéressant de noter que nous observons une augmentation ainsi qu'une plus grande variation du diamètre des microtubules de la cellule pilier interne. Un tel phénomène a également été observé chez *C. elegans* (Cueva *et al.*, 2012) mais nous sommes les premiers à l'illustrer chez le mammifère.

Chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, l'inhibition d'ATAT1 mène à un raccourcissement du corps, à des défauts neuromusculaires ainsi qu'à une diminution de la taille des yeux et de la tête (Akella *et al.*, 2010). Mais malgré l'importante acétylation des microtubules des cellules de soutien observée sur nos prélèvements ainsi que dans plusieurs autres études (Li et Yang, 2015; Szarama *et al.*, 2012; Tannenbaum et Slepecky, 1997), les souris invalidées pour ATAT1 ne semblent pas présenter de défaut majeur durant leur développement.

Nous montrons ainsi qu'au sein de l'organe de Corti, l'acétylation de la tubuline  $\alpha$  n'est pas indispensable à la constitution et au maintien des microtubules à 15 protofilaments qui composent le cytosquelette des cellules piliers internes. L'acétylation de la tubuline  $\alpha$  semble en revanche nécessaire dans la régulation du diamètre des microtubules.



## Dispensability of Tubulin Acetylation for 15-protofilament Microtubule Formation in the Mammalian Cochlea

Justine Renaud<sup>1,2</sup>, Nicolas Thelen<sup>1\*</sup>, Odile Bartholomé<sup>1</sup>, Brigitte Malgrange<sup>3</sup>, and Marc Thiry<sup>1</sup>

<sup>1</sup>GIGA-Neurosciences, Cell Biology Unit, University of Liège, Liège, Belgium, <sup>2</sup>Department of Otolaryngology, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, United States of America,

<sup>3</sup>GIGA-Neurosciences, Developmental Neurobiology Unit, University of Liège, Liège, Belgium

**ABSTRACT.** The development of hearing in mammals requires the formation and maturation of a highly organized and specialized epithelium known as the organ of Corti. This epithelium contains two types of cells, the sensory cells, which are the true receptors of auditory information, and the surrounding supporting cells, which are composed of a highly developed cytoskeleton essential to the architecture of the mature organ of Corti. The supporting cells are the only mammalian cells reported to contain the unusual 15-protofilament microtubules. In this paper, we show that 15-protofilament microtubules appear between the second and fourth day after birth in the pillar cells of the organ of Corti in mice. We also show that contrary to what has been described in the nematode worm *Caenorhabditis. elegans*, microtubule acetylation is not essential for the formation of 15- protofilament microtubules in mice but is required for fine-tuning of their diameter.

**Key words:** Acetylation, cytoskeleton, microtubule, inner ear, supporting cells

### Introduction

The development of hearing requires the formation and maturation of a highly organized and specialized epithelium known as the organ of Corti (Roth and Bruns, 1992). Sound vibrations cause the displacement of fluid within the inner ear, which results in the movement of mechanosensory hair cells in the organ of Corti. The deflection of hair cell stereocilia causes depolarization and triggers the release of the excitatory neurotransmitter glutamate, resulting in the transduction of auditory vibration signals into an electrical signal that is sent through the auditory nerve to the brain (Pickles, 2015).

The cytoskeletal elements of the organ of Corti, which include an abundant amount of actin filaments within the stereocilia of the sensory cells as well as microtubules within the surrounding supporting cells, have been studied for decades for their importance in developing and maintaining the precise morphology of the organ required for hearing (Andrade, 2015; Henderson *et al.*, 1994; Zetes *et al.*, 2012). The mature pillar cells are characterized by an abundant and highly organized cytoskeleton framework

that confers stiffness that protects the cells from mechanical deformation, which occurs each time a sound wave is transmitted to the inner ear (Henderson *et al.*, 1995; Tolomeo and Holley, 1997). The opening of the tunnel of Corti is an essential step in the maturation of the hearing organ, in which the supporting cells increase their length and detach from each other. This allows the intercellular space to be filled with the vibration-conducting cochlear fluid (Ito *et al.*, 1995). Furthermore, an absence of this triangular open space between the pillar cells has been shown to be a potential reason for hearing loss. Indeed, mutation of the gap junction connexin 26, the most common cause of congenital sensorineural hearing loss, has been linked with the maturation of pillar cells. The downregulation of connexin 26 before the opening of the tunnel of Corti decreases the number of microtubules within the pillar cells. This has been associated with the failure of the tunnel of Corti to open and resultant deafness (Chen *et al.*, 2018).

The unique characteristic of pillar microtubules is that they are composed of 15 protofilaments (pf) instead of the common 13 pf encountered in mammalian cells (Kikuchi *et al.*, 1991; Tucker *et al.*, 1992). Several papers already show the relationship between 15-pf microtubules and large bundle stability (Chalfie and Thomson, 1982; Topalidou *et al.*, 2012). Furthermore, other researchers have already established the correlation between tubulin isotype, posttranslational modification such as acetylation and pf number (Cueva *et al.*, 2012; Savage *et al.*, 1989; Ti *et al.*, 2018).

\*To whom correspondence should be addressed: Nicolas Thelen, GIGA-Neurosciences, Cell Biology Unit, University of Liège, Liège, Belgium.

Tel: +3243665169

E-mail: nthelen@uliege.be

Abbreviations: MAPs, microtubules associated proteins; Pf, protofilament; P, postnatal day.

The presence of unusual pf numbers per microtubule has been previously reported in invertebrates. For example, it has been shown that in the moth *Heliothis virescens*, the expression of a specific  $\beta$ -tubulin isotype ( $\beta 2$ ) is responsible for the formation of 16-pf microtubules contained within spermatid axonemes (Raff, 1997). Interestingly, this same study reported that the expression of this particular  $\beta$ -tubulin isotype in *Drosophila* leads to the formation of 16-pf microtubules instead of the 13-pf microtubules usually present in the same subset of microtubules of the axoneme. Additionally, *C. elegans* were used to show the essential role of certain isoforms of alpha or beta tubulin in the formation of unusual microtubules and their functional role in touch sensitivity (Bounoutas *et al.*, 2009; Fukushige *et al.*, 1999; Savage *et al.*, 1989; Wade, 2009). In subsequent invertebrate studies, acetylation of microtubules was implicated in the formation of microtubules with 15 pf (Cueva *et al.*, 2012; Topalidou *et al.*, 2012). However, the occurrence of distinct morphological changes and the importance of various tubulin isotypes or their posttranslational modifications is less well reported in vertebrates.

In this work, we studied the fine structure of microtubules in pillar cells of the organ of Corti in mice. We were interested in the early stages after birth, between P0 and P25, a critical period in the development of hearing. We also examined the number of pf in microtubules in pillar cells in a mutant mouse depleted for acetyltransferase *Atat1*, an enzyme known to acetylate alpha tubulins. Our results reveal that the microtubules of the pillar cells consist of 13 pf in the early postnatal stage and rapidly acquire 15 pf from P4 onwards. We also show that the formation of microtubules with 15 pf is not affected by tubulin acetylation, contrary to what has been described in invertebrates.

## Materials and Methods

### Mice

Animal handling was carried out in compliance with the University of Liege Animal Care and Use Committee guidelines. The NMRI mice were bred in our animal facility.

Acetyl transferase *Atat1* mutant mice come from 'The Knock-out Mouse Project' referenced as *Atat1*<sup>tm1(KOMP)vlcg</sup>. Heterozygous mice are used for reproduction and offspring are genotyped by PCR as previously reported (Kim *et al.*, 2013). The day of birth was recorded as post-natal day 0 (P0). NMRI mice were sacrificed at different time points from P0 to P30. Forceps were used to dissect the cochleae under a stereomicroscope. The cochlear apex was carefully pierced to allow rapid penetration of the fixative.

### Immunohistochemistry

The cochleae were fixed in a solution composed of 2% formaldehyde in PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 16

mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4) for 1 h at 4°C. After 3 washes at 4°C in PBS, the cochleae were decalcified at 4°C in 4% (w/v) EDTA in PBS as long as necessary. The samples were then washed several times in PBS and incubated at 4°C in 30% (w/v) sucrose in PBS on a gently rotating platform until the cochleae sank in the tube. The cochleae were embedded in 7.5% (w/v) gelatin and 15% (w/v) sucrose in PBS for 15 min at 37°C. The preparation was finally plunged into an isopentane bath on dry ice for solidification. The cryosections (12  $\mu\text{m}$  thick) were obtained by a cryostat (Microm HM 560, Prosan).

The cryosections were rinsed in PBS. The sections were permeabilized and blocked in PGT (PBS – 0.25% gelatin- 0.3% triton X100 ) for 30 min. Then, the sections were incubated with the primary antibody solution diluted in PGT overnight at 4°C (1/10 000 - mouse anti-acetylated alpha-tubulin antibody - T6793, Sigma-Aldrich; 1/150 - rabbit anti-myosin VI antibody - M5187, Sigma-Aldrich). The sections were washed in PBS and incubated for 30 min at 37°C with the secondary antibody diluted in PBS (1/250 - goat anti-rabbit Alexa 594 antibody - R37117, Thermo Fisher Scientific; 1/250 - goat anti-mouse Alexa 488 antibody - A-11001, Thermo Fisher Scientific). After being washed in PBS, the nuclei were stained by incubating the sections with DAPI (1: 50,000, 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma, St Louis, USA) at 37°C for 15 min. Finally, the cryosections were rinsed in PBS and mounted with Citifluor AF1 (Laborimpex, Brussels, Belgium).

The mid- and basal turns of the cochlea were analyzed. The slides were examined under an Olympus FV1000 confocal microscope using a 60x objective. The optical sections were analyzed with the FV10-ASW 1.7 viewer software.

### Electron microscopy

The cochleae were fixed under vacuum for 1 h at room temperature in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Sørensen's buffer pH 7.4. After 3 washes in Sørensen's buffer, the samples were permeabilized under vacuum with 2% digitonin during 1 to 2 hours at room temperature. The cochleae were washed in Sørensen's buffer before being put in contact with 4% tannic acid in Sorensen pH 6.8 for an hour at room temperature under vacuum. This additional step allows the visualization of the number of pf (adaptation of the tannic acid protocol developed by Tilney in 1973 (Tilney *et al.*, 1973)). After 3 washes, the adult cochleae were decalcified in 4% EDTA. The samples were then post-fixed for 60 min with 2% osmium tetroxide in Sørensen's buffer pH 7.4, washed in deionized water, dehydrated at room temperature through a graded ethanol series (70, 96 and 100%), and embedded in Epon for 48 h at 60°C. Semithin (1  $\mu\text{m}$  thick) and ultrathin sections (50 nm thick) were obtained by means of an ultramicrotome (Reichert Ultracut E) equipped with a diamond knife (Diatome). Ultrathin sections were mounted on copper grids and were contrasted with uranyl acetate and lead citrate for 15 min each (Reynolds, 1963).

Semithin sections were put on a glass slide and stained with 1% toluidine blue in sodium tetraborate (1% solution,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) and then covered with a coverslip sealed with Entellan® (Merck,

Overijse, Belgium). The slides were examined under a Zeiss Axio-plan microscope. Ultrathin sections were examined with a Jeol JEM- 1400 transmission electron microscope at 80 kV and photographed with a 11 MegaPixel bottom-mounted TEM camera system (Quemesa, Olympus). The images were analyzed via iTEM software (Olympus SIS).

**Quantifications and statistical analysis**

The measurement of the diameter was taken from the center of a pf to the center of the pf located on the opposite side. If the microtubule was not perfectly circular, the smallest diameter was measured to avoid variability due to oblique sections through the microtubules. One-way analysis of variance statistical test followed by Tukey-Kramer test was performed using the software Past 4 software (Hammer *et al.*, 2001). In order to compare the microtubule diameter in WT and *Atat1* KO mice, unpaired t-test and F-test have been used with the same software.

**Analyses of microtubule diameter**

Each condition was analyzed as follows: 3 animals per condition for P2, P4 and P30 pillar cells, 6 pictures per animal, 3 random microtubules measured per pictures. 3 animals for the kinocilium measurement, 2 pictures per animal, 4 random microtubules measured per picture.

**Analyses between WT and *Atat1* KO mice**

Only microtubules present in a bundle were analyzed. Each condition was analyzed as follows: 3 animals per condition, 10 pictures

per animal, 5 random microtubules measured per picture.

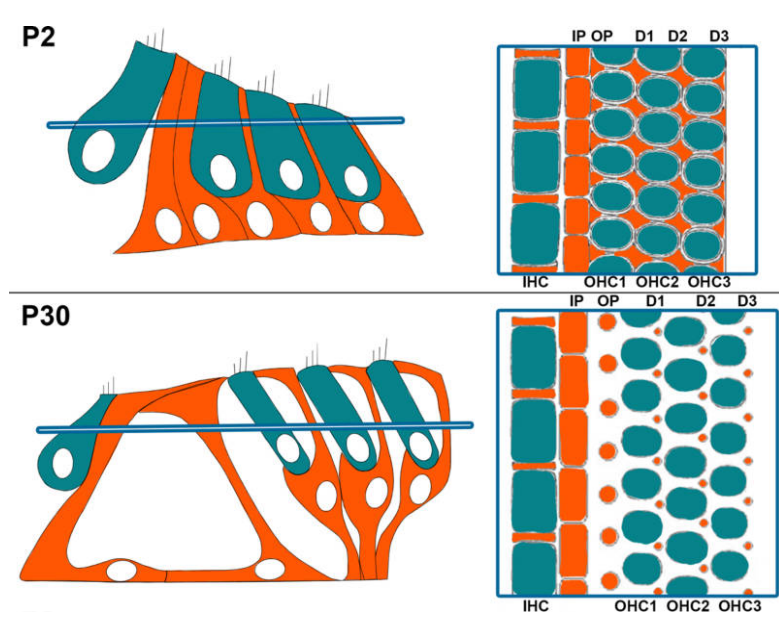
**Analyses of microtubule pf number and density (Fig. S1)**

For the analysis of microtubule pf, 11 microtubules with clearly distinguishable pf were selected in inner pillar cell of each condition. The density was calculated on ultrathin section of pillar cell medial part by dividing the total number of microtubules by the area of the cell.

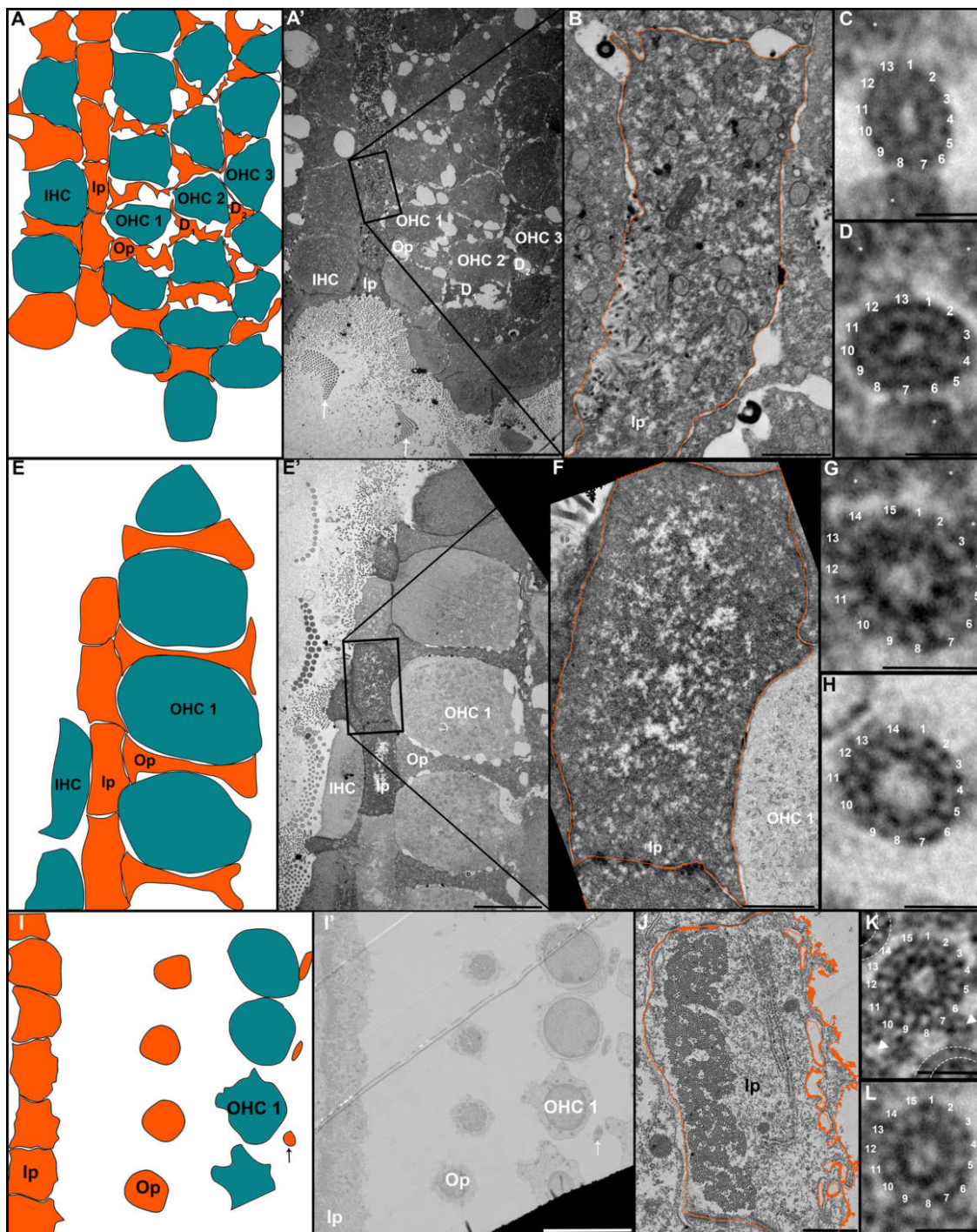
**Results**

**The number of pf in microtubules of the pillar cells as well as their diameter changes during the development of the auditory organ**

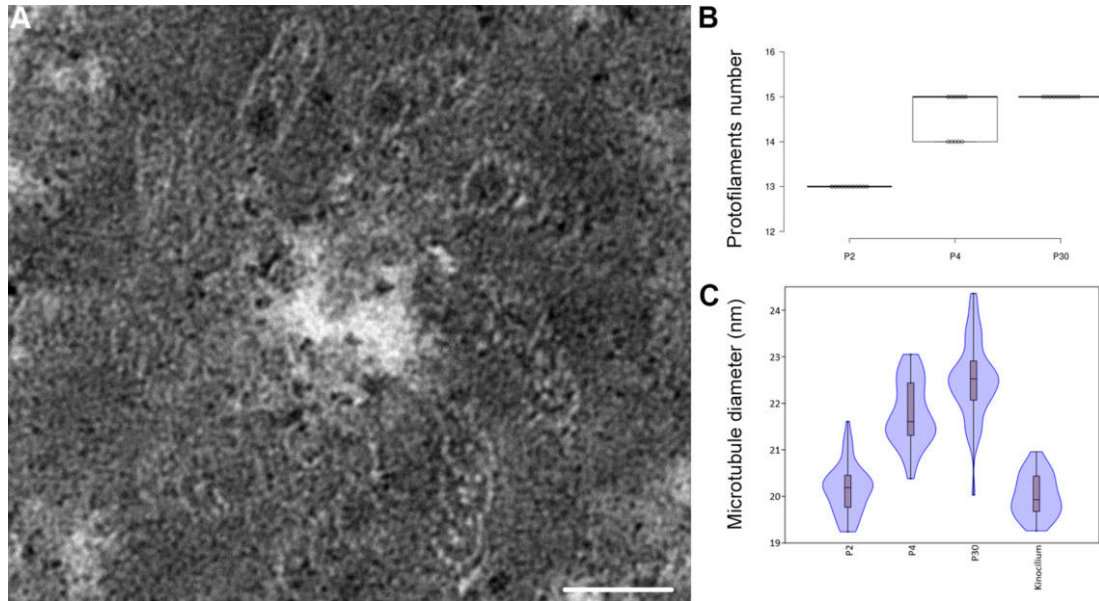
We examined the morphology of microtubules present in pillar cells between P2 and P30 by transmission electron microscopy as seen in Fig. 1. Tannic acid was used in the sample preparation to better visualize the pf. Transverse sections of pillar cells at P2 (Fig. 2A-A') show few microtubules, surrounded by electron dense material (Fig. 2B). A high magnification image of microtubules containing 13 pf is seen (Fig. 2C-D). At P4, the microtubules occupy a larger surface area of the cytoplasm of the pillar cells (Fig. S1). The electron-dense material observed at P2 is still present (Fig. 2G asterisks). At higher magnification, we identify microtubules at 14 and 15 pf (Fig. 2G and 2H). On cross sections of pillar cells at P25 (Fig. 2I and 2I'), the number of microtubules is higher compared to the previous



**Fig. 1.** Schematic representation of the organization of the organ of Corti. Transverse (left) and orthogonal view (right) at P2 (top) or P30 (bottom). The section plan is indicated in blue. IHC: inner hair cell; Ip: inner pillar cell; OHC: outer hair cell; Op: outer pillar cell; D1 to D3: Deiters' cell 1 to 3.



**Fig. 2.** Increase in the number of microtubule protofilaments during the development of the inner pillar cells of the hearing organ. Schematic representation at P2 (A), P4 (E) and P30 (I). General view at P2 (A'), P4 (E') and P30 (I'). Detail of the cytoplasm of an inner pillar cell at P2 (B), P4 (F) and P30 (J). High magnification of individual microtubules at P2 (C and D), P4 (G and H) and at P30 (K and L). IHC: inner hair cell; Ip: inner pillar cell; OHC 1 to 3: outer hair cell 1 to 3; Op: outer pillar cell; D1 to 2: Deiters' cell 1 to 2. The arrows in panel A' indicate the stereocilia of sensory cells. The arrow in panel I' indicates the phalangeal process of a Deiters' cell. The arrowheads in panel K indicate dense material linking microtubule together. Asterisks indicate electron dense materials in panels C, D, G. Dashed lines indicated adjacent microtubules in panel K. Scale bars: 10  $\mu$ m (A', E' and I'), 1  $\mu$ m (B, F and J) and 20 nm (C, D, G, H, K and L).



**Fig. 3.** Increase in the diameter of the microtubules during the development of the inner pillar cells of the hearing organ. Ultrastructure of the basal body of a kinocilium in hair cell (A), and representation of the number of protofilament per microtubule of supporting cells at P2, P4 and P30 (B). Violin plot comparing the average diameter of microtubules present in supporting cells at P2, P4 and P30 and microtubules in the kinocilium (C). Scale bar: 50 nm.

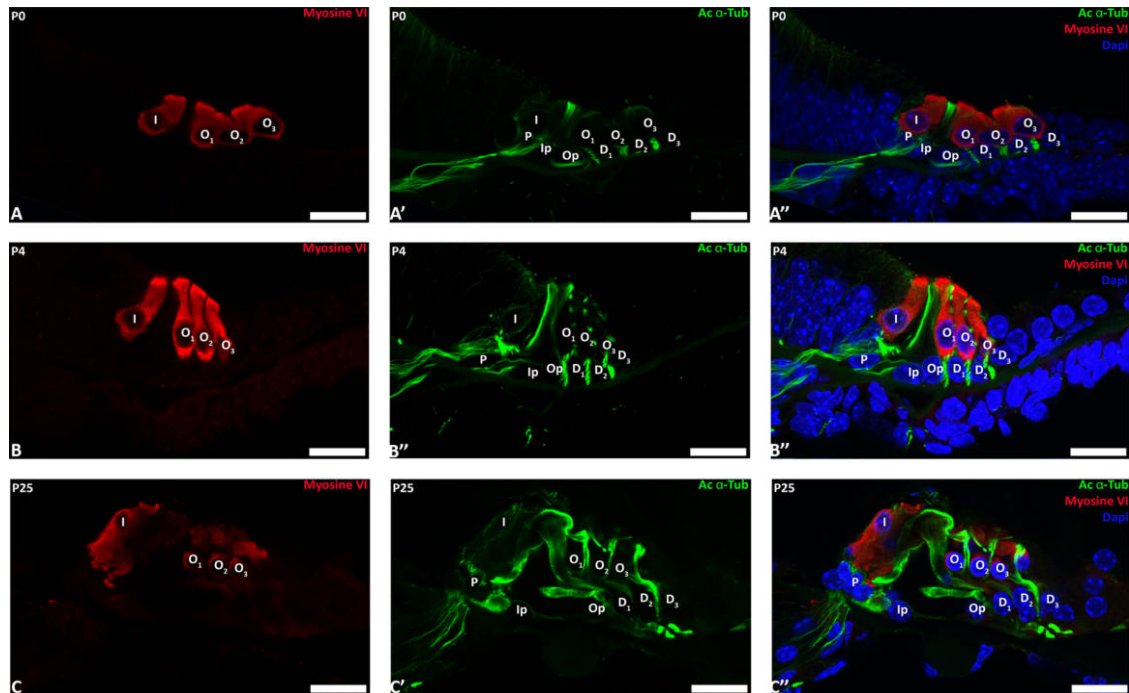
**Table I.** STATISTICAL ANALYSIS OF MICROTUBULES DIAMETER WITHIN THE INNER PILLAR CELL AND THE KINOCILIUM OF THE HEARING ORGAN IN MICE: TUKEY'S MULTIPLE COMPARISON TEST PERFORMED BETWEEN EACH SAMPLE.

	P2	P4	P30	Kinocilium
Number of values	54	54	54	24
Microtubule Diameter - Mean ( $\mu\text{m}$ )	20.16	21.78	22.5	20.02
Microtubule Diameter - Std. Deviation	0.5286	0.6749	0.8185	0.4597
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? $P < 0.05$ ?	Summary
P2 vs P4	-1.629	18.14	Yes	***
P2 vs P30	-2.347	26.13	Yes	***
P2 vs Kinocilium	0.1351	1.18	No	ns
P4 vs P30	-0.7181	7.994	Yes	***
P4 vs Kinocilium	1.764	15.41	Yes	***
P30 vs Kinocilium	2.483	21.68	Yes	***

stages (Fig. S1). They form a compact bundle within a thinned cytoplasm, across the entire width of the cells (Fig. 2J). The microtubule bundle is organized in a very regular geometric structure in which the microtubules are connected by dense material (Fig. 2K arrowheads). At this stage, the microtubules consist of 15 pf (Fig. 2K and 2L).

The number of protofilaments per microtubule increase from 13 at P2 to 15 at P30, with an intermediate stage of 14 and 15pf at P4 (Fig. 3B). Due to the low number of microtubules at P2 and the difficulty of slicing exactly perpendicular sections in order to count the number of pf, we also measured the diameter of each microtubule in pillar cells to compare the microtubules between P2 and P30. The microtubules present in the kinocilium of sensory cells were used

at P2 (Fig. 3A) to act as a 13 pf control. Statistical analysis indicated a significantly smaller diameter of the microtubules in kinocilium in comparison to those present in P4 and the mature pillar cells (Fig. 3C). We repeated this measurement between early pillar cells (P2 and P4) and mature pillar cells (P30), and found a smaller diameter in the microtubules present in pillar cells at P2 and P4 compared to those present at P30 (Fig. 3C and Table I). The average diameter of the microtubules present in early pillar cells is comparable to the diameters seen in kinocilium, confirming the presence of 13 pf at P2. To assess the increase of microtubule numbers during the development, their number and density per  $\mu\text{m}^2$  was analyzed in the medial part of the inner pillar cell from P2 to P30. Even if



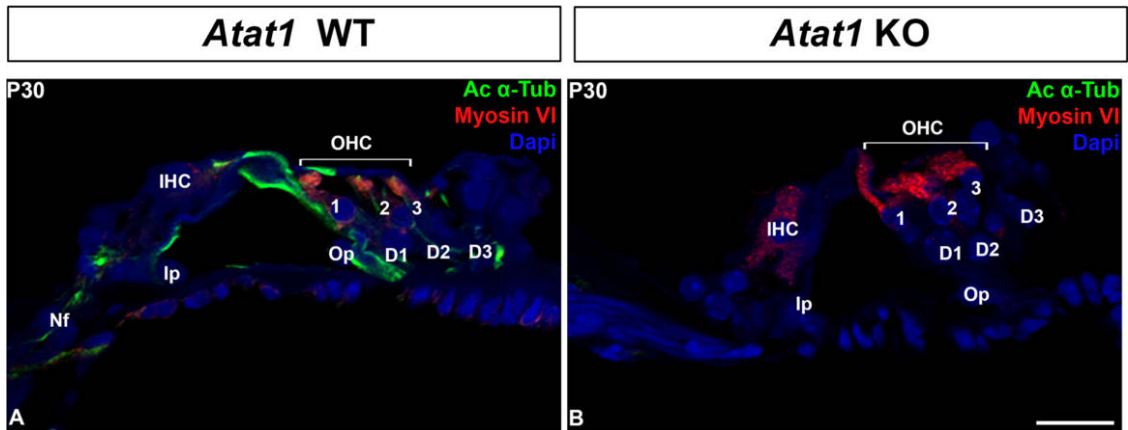
**Fig. 4.** Acetylation of microtubule tubulins of pillar cells between P0 and P25. Confocal immunostaining of P0 (A), P4 (B) and P25 cochlear sections. Acetylated  $\alpha$ -tubulin is labeled in green, myosin VI is labelled in red (sensory cells labeling). Nucleus are labelled by DAPI (Blue). I: inner hair cell; Ip: inner pillar cell; O 1 to 3: outer hair cell 1 to 3; Op: outer pillar cell; D1 to D3: Deiters' cell 1 to 3; P: phalangeal cell. Scale bars: 20  $\mu$ m.

they are not evenly distributed in the cytoplasm, the density of microtubule increases from  $8,88/\mu\text{m}^2$  at P2 to  $173,56/\mu\text{m}^2$  at P30 (Fig. S1). Those data are in accordance with previously published data in which the number of microtubules and density increase during development of pillar cells (Szarama *et al.*, 2012; Tucker *et al.*, 1992).

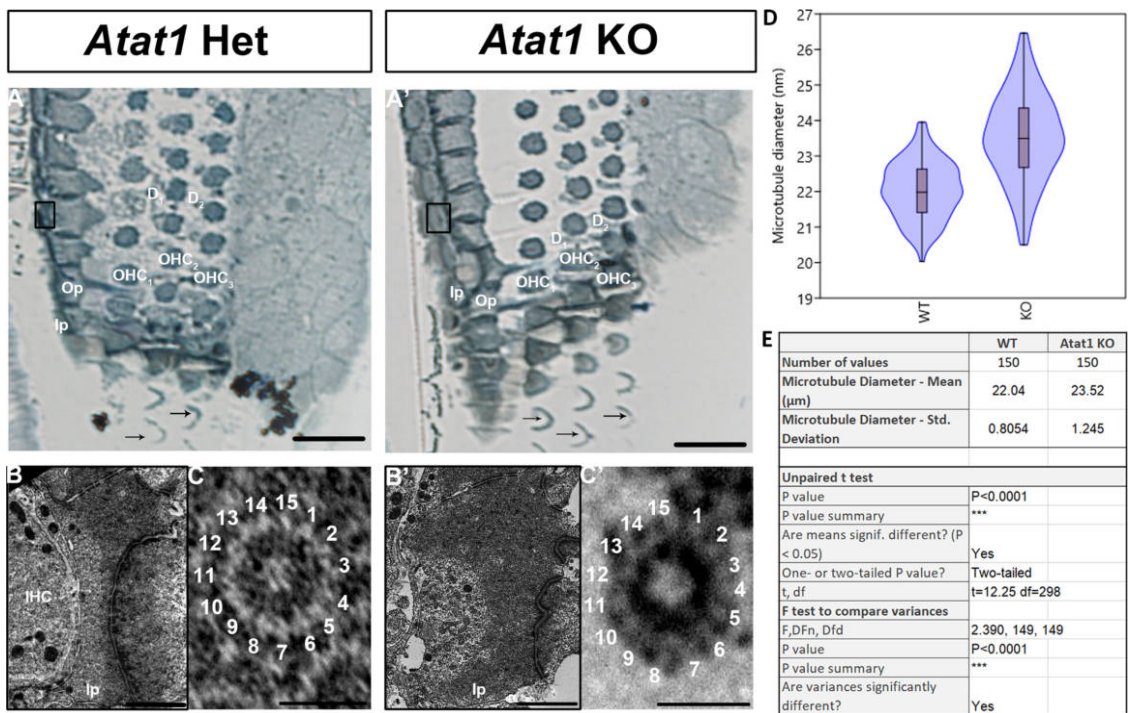
#### ***Acetylation of microtubules in pillar cells is not necessary for 15-pf microtubules***

Acetylation of tubulins is implicated in the modification of the number of pf in invertebrates by a mechanism that is not yet fully understood (Cueva *et al.*, 2012; Topalidou *et al.*, 2012). Previous studies stipulated that acetylation is necessary but not sufficient for the formation of 15-pf microtubules, suggesting that this enzyme plays an indirect role in the formation of those unusual microtubules (Howes *et al.*, 2014; Li and Yang, 2015). To analyze the implication of this post-translational modification in the development of the organ of Corti, we first analyzed this process in the pillar cells of the organ of Corti at P0, P4 and P25 (Fig. 4A-B-C). The acetylation of microtubules in pillar cells is present at their apex at P0 (Fig. 4A) and extends in the longitudinal axis at P4 (Fig. 4B). The microtubule bundle is acetylated at P25 from the apex to the base of the cell (Fig. 4C). Previous work has shown that this acetylation is the

result of the acetyltransferase ATAT1 enzyme (Kalebic *et al.*, 2013). In this context, we analyzed the acetylation of the microtubules in a mouse model deleted for this enzyme. First, in order to verify that the mutant mouse depleted for acetyltransferase ATAT1 no longer contains acetylated alpha tubulin we applied immunofluorescence labelling with an anti-acetylated alpha tubulin antibody. At P30, we observed no labelling in the organ of Corti of the mutant mouse unlike the wild-type mouse, attesting to the absence of acetylation of alpha tubulins in the mutant devoid of the ATAT1 enzyme (Fig. 5A-B). Next, we analyzed the morphology of the organ of Corti in WT or heterozygous and *Atat1* KO mice at P30 on semi-thin section (Fig. 6A-B). The general morphology of the organ of Corti, such as its cell organization, the size of the pillar cell or the tunnel of Corti appeared unaffected by the absence of tubulin acetylation. We then analyzed the morphology and the diameter of microtubules at higher magnification (Fig. 6C, D and E). The number of pf per microtubule is 15 for *Atat1* Heterozygous and KO mice (Fig. 6C and D). Interestingly, the average diameter of the microtubules of pillar cells is larger and more variable in *Atat1* KO compared to *Atat1* Heterozygous, as seen in the Violin plot (Fig. 6D and E) (Mean (SD): Heterozygous 22,0376 nm (0.805) n=150; *Atat1* KO: 23,5211 nm (1,2451) n=150). Unpaired t test : P<0.0001 ; F test for variance P<0.0001.



**Fig. 5.** Absence of acetylated microtubules in the mutant *Atat1* mouse. Immunostaining of section of organ of Corti in WT (A) and *Atat1* KO at P30. Acetylated  $\alpha$ -tubulin is labeled in green, myosin VI is labeled in red (sensory cells labeling). Nucleus are labelled by DAPI (Blue). I: inner hair cell; Ip: inner pillar cell; Nf: Nerve fibers; O 1 to 3: outer hair cell 1 to 3; Op: outer pillar cell; D1 to D3: Deiters' cell 1 to 3; P: phalangeal cell. Scale bars: 20  $\mu$ m.



**Fig. 6.** Tubulin acetylation is not required for 15-pf microtubule formation in mice. Semithin section of the organ of Corti (A-A'). Ultrastructure of pillar cells at P30 (B-B'). High magnification of individual microtubules (C-C'). Violin and box plot of the mean of the diameter of pillar cells' microtubules (D) and associated statistical analysis (E). IHC: inner hair cell; Ip: inner pillar cell; OHC: outer hair cell; Op: outer pillar cell; D1 to D2: Deiters' cell 1 to 2. The arrows indicate the stereocilia of sensory cells. Scale bars: 50  $\mu$ m (A-A'), 2  $\mu$ m (B-B') and 20 nm (C-C').

**Discussion**

In this study, we analyzed the morphology of microtubules in the organ of Corti during development in mice. In the adult organ of Corti, the number of pf is 15 in pillar cells. In vertebrates, those supporting cells are the only ones that

do not have the usual 13-pf configuration (Kikuchi *et al.*, 1991; Tucker *et al.*, 1992). The function of those unusual 15-pf microtubules in the hearing process is still unknown, though it has been proposed that the 15-pf structure provides rigidity (Chaaban and Brouhard, 2017). In the worm *C. elegans*, several studies have shown that the loss of 15-

pf structure can lead to loss of function of the mechanoreceptor (Bounoutas *et al.*, 2009). This suggests that mutations or loss of this pf arrangement may play a role in hearing loss or other pathologies.

One known difference between the 13- and 15-pf configuration is the disappearance of the seam running along the length of the microtubule (Li *et al.*, 2002; Sui and Downing, 2010). In this situation, the microtubules adopt a conformation in which each  $\alpha$ -tubulin is located next to another  $\alpha$ -tubulin of the adjacent pf. It has been hypothesized that this seam gives a line of weakness and could act as a trigger point for disassembly (Ayoub *et al.*, 2015; Katsuki *et al.*, 2014; Wade, 2009). Therefore, in the organ of Corti, this may suggest that the existence of those 15-pf microtubules may fulfill the functional needs of those supporting cells and give stability to the cell. In this study, we showed that the number of pf increase from the 13 to 15 pf early in development, around P4. This early modification is made before the hearing onset and could be a prerequisite to the correct function of the organ of Corti. This is further supported by the fact that these cells are situated between the sensory cells and the basilar membrane and play a key role in the propagation of sound waves. At P25, we also observed well-organized bundles of microtubules in which the microtubules are linked together by electron-dense material that could correspond to cross-linking proteins. This organization also provides resistance to bending and stretching (Liew *et al.*, 2015; Tolomeo and Holley, 1997). Until now, no study has shown the impact of the absence of those unusual 15-pf microtubules on auditory function. This is because it is unknown how to specifically alter the 15-pf microtubules in mammals.

Given the dispensability of tubulin acetylation in the formation of 15-pf microtubules in pillar cells, the tubulin isoforms could be another means of regulating the number of pf in microtubules in vertebrates. In fact, it was previously shown that  $\beta$ -tubulin isoforms play an important role in the architecture of microtubules in invertebrates (Meurer-Grob *et al.*, 2001). The presence of an unusual pf number per microtubule were extensively studied in invertebrates such as *Drosophila*, in which the presence of a specific moth beta-tubulin isoform can induce the formation of these unusual 15-pf microtubules (Raff, 1997). This result showed that this  $\beta$ -tubulin isoform is sufficient to induce the formation of 16-pf microtubules. In this study, we showed that 15-pf microtubules appear between P2 and P4, which correspond to the appearance of the expression of  $\beta$ V-tubulin isoform. In this regard, it would be interesting to analyze the role of the  $\beta$ V-tubulin isoform in the formation of 15-pf microtubules, as our previous research showed that this isoform is only expressed in the pillar and Deiters' cells of the organ of Corti (Renauld *et al.*, 2015). Our previous publication on the spatiotemporal dynamic of  $\beta$ -tubulin isoforms during the development of the organ of Corti highlighted the specific pattern of the  $\beta$ -V-tubulin that appears

at a key stage of the supporting cells' development. The correlation between the timing and localization of the 15-pf microtubules and the expression of this isoform make it an interesting candidate for the formation of 15-pf microtubules.

One mechanism expected to control microtubule function is the post-translational modification of their tubulin subunits (Janke, 2014; Janke and Montagnac, 2017). The acetylation of the  $\alpha$ -tubulin constrains the 15-pf number in the worm, *C. elegans* (Cueva *et al.*, 2012). Here, we demonstrated that the acetylation was dispensable to create or maintain 15-pf microtubules inside the organ of Corti, as we did not find any difference in the number of pf between the WT and the *Atat1* KO mice. In *C. elegans*, the acetylation of the  $\alpha$ -tubulin was a determinant for the formation of those unusual microtubules and also for their number and organization (Topalidou *et al.*, 2012). Interestingly, despite the constant 15-pf microtubules, we also observed that microtubules varied in diameter, as observed in *C. elegans* (Topalidou *et al.*, 2012). This greater variation in diameter in *Atat1* KO mice could be explained by the model proposed by Cueva in which the acetylation of  $\alpha$ -tubulin stabilizes interprotofilament salt bridges between adjacent  $\alpha$ -tubulins (Cueva *et al.*, 2012). Cueva stipulated that the acetylation of the  $\alpha$ -tubulin disrupt an intramonomere salt bridge to create an intermonomere salt bridge instead. This new intermonomere salt bridge would change the lateral interactions between  $\alpha$ -tubulins leading to an interprotofilament angle in favor of 15 pf. In this study of the pillar cells, the absence of acetylation would increase the range of value of the interprotofilament angle which would increase the diameter variability, but other parameter, such as the nature of the tubulin isoforms, the microtubule associated proteins or other posttranslational modifications would restrain this angle enough to maintain the number of pf constant even if the diameter changes. It should therefore be interesting to study all these parameters in order to understand which ones impose the formation of microtubules at 15 pf.

Furthermore, *in vitro* research demonstrated that the acetylation itself of the lysine in position 40 of the  $\alpha$ -tubulin had no significant effect on microtubule structure (Howes *et al.*, 2014). For this reason, in 2015, Li and his coworker hypothesized the acetylation of the  $\alpha$ -tubulin may form a specific docking site for an unidentified protein. This unidentified protein may then promote the formation of 15-pf microtubules (Li and Yang, 2015).

In addition to the isoform of tubulin, acetylation is probably not the only factor influencing the number of pf in vertebrates. Several studies have shown that some microtubule associated proteins (MAPs) like doublecortin or kinesin promote the formation of 13-pf microtubules (Akhmanova and Severin, 2004; Howes *et al.*, 2014; Moores *et al.*, 2004). It would not be surprising to discover some MAPs that promote 15-pf microtubules in pillar cells.

The study showing the absence of physiological differ-

ence in the *Atat1* KO hearing published in 2013 was surprising for us as we were expecting a more important role of this enzyme in hearing based on previous data in zebrafish (Kim *et al.*, 2013). In the zebrafish model, the inhibition of this enzyme leads to developmental defects such as shortening of the body, neuromuscular defects, or reduction of eye and head size (Akella *et al.*, 2010). Furthermore, abundant numbers of acetylated microtubules were reported in the cochlea in pillar and Deiter's cells (Li and Yang, 2015; Szarama *et al.*, 2012; Tannenbaum and Slepecky, 1997) as observed in our immunofluorescence labeling for acetylated tubulin, and ATAT1 as the enzyme responsible for the acetylation of the tubulin in mice (Kalebic *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018; Shida *et al.*, 2010). We observed the disappearance of the acetylated microtubules in the pillar cells of the *Atat1* KO mice, confirming the hypothesis that this enzyme is responsible of the acetylation of the microtubules present in pillar cells. This result showed that the inhibition of tubulin acetylation doesn't lead to any developmental defects in mammalian cells which contain a large amount of acetylated microtubules in contrast to the zebrafish study (Akella *et al.*, 2010). Other studies performed on *Chlamydomonas reinhardtii* and *Tetrahymena thermophile* showed that the modification of  $\alpha$ -tubulin to prevent its acetylation didn't create any phenotype in those models (Gaertig *et al.*, 1995; Kozminski *et al.*, 1993). It's important to note that when the enzyme responsible for the deacetylation of microtubules is absent, resulting in hyperacetylation of microtubules, there is no major alteration in the phenotype of mice either. This data seems to show a high tolerance in the level of acetylation of microtubules in mice (Zhang *et al.*, 2008). This tubulin acetylation may not be essential to the development of organisms but could play a role in their adaptation to their environment (Janke and Montagnac, 2017).

In conclusion, we show for the first time that 15-pf microtubules appear between the second and fourth day after birth in the mouse pillar cells. We also show that contrary to what has been observed in the nematode worm *C. elegans*, the acetylation of those microtubules is not essential for the formation of the 15-pf microtubule structure, even if we see an increase in diameter variability. Further mutational research would be necessary to confirm if one of the tubulin isotypes expressed in those cells leads to this 15-pf microtubule production and the role of this specific microtubule structure in hearing development.

**Acknowledgments.** We thank Mrs Patricia Piscicelli for her skillful technical assistance in transmission electron microscopy.

We thank the GIGA-Imaging and Flow Cytometry platform for technical support.

This work was supported by Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS-FRS). J.R. was a PhD grant holder of the FRIA.

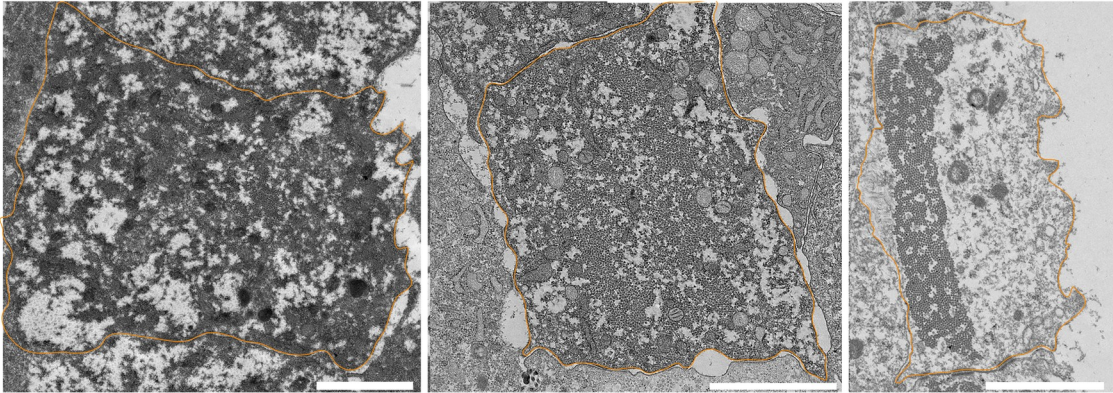
## Contribution

J.R., N.T and M.T designed the study. J.R. performed many of the experiments. N.T. and O.B. measured the microtubule diameter. B.M. shared *Atat1* animal colonies. J.R and N.T. contributed to data interpretation and J.R wrote the manuscript with input from all coauthors.

## References

- Akella, J.S., Wloga, D., Kim, J., Starostina, N.G., Lyons-Abbott, S., Morrissette, N.S., Dougan, S.T., Kipreos, E.T., and Gaertig, J. 2010. MEC-17 is an  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase. *Nature*, **467**: 218–222.
- Akhmanova, A. and Severin, F. 2004. Thirteen is the lucky number for doublecortin. *Dev. Cell*, **7**: 5–6.
- Andrade, L.R. 2015. Evidence for changes in beta- and gamma-actin proportions during inner ear hair cell life. *Cytoskeleton*, **72**: 282–291.
- Ayoub, A.T., Klobukowski, M., and Tuszynski, J.A. 2015. Detailed Per-residue Energetic Analysis Explains the Driving Force for Microtubule Disassembly. *PLoS Comput. Biol.*, **11**: 1–21.
- Bounoutas, A., O'Hagan, R., and Chalfie, M. 2009. The Multipurpose 15-Protofilament Microtubules in *C. elegans* Have Specific Roles in Mechanosensation. *Curr. Biol.*, **19**: 1362–1367.
- Chaaban, S. and Brouhard, G.J. 2017. A microtubule bestiary: Structural diversity in tubulin polymers. *Mol. Biol. Cell*, **28**: 2924–2931.
- Chalfie, M. and Thomson, J.N. 1982. Structural and functional diversity in the neuronal microtubules of *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.*, **93**: 15–23.
- Chen, S., Xie, L., Xu, K., Cao, H.-Y., Wu, X., Xu, X.-X., Sun, Y., and Kong, W.-J. 2018. Developmental abnormalities in supporting cell phalangeal processes and cytoskeleton in the *Gjb2* knockdown mouse model. *Dis. Model. Mech.*, **11**: dmm033019.
- Cueva, J.G., Hsin, J., Huang, K.C., Goodman, M.B., and Cueva *et al.* 2012. Posttranslational Acetylation of  $\alpha$ -Tubulin Constrains Protofilament Number in Native Microtubules. *Curr. Biol.*, **22**: 1066–1074.
- Fukushige, T., Siddiqui, Z.K., Chou, M., Culotti, J.G., Gogonea, C.B., Siddiqui, S.S., and Hamelin, M. 1999. MEC-12, an alpha-tubulin required for touch sensitivity in *C. elegans*. *J. Cell Sci.*, **112** (Pt 3): 395–403.
- Gaertig, J., Cruz, M.A., Bowen, J., Gu, L., Pennock, D.G., and Gorovsky, M.A. 1995. Acetylation of lysine 40 in  $\alpha$ -tubulin is not essential in *Tetrahymena thermophila*. *J. Cell Biol.*, **129**: 1301–1310.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and Paul D. Ryan. 2001. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.*, **4**: 1–9.
- Henderson, C.G., Tucker, J.B., Chaplin, M. a, Mackie, J.B., Maidment, S.N., Mogensen, M.M., and Paton, C.C. 1994. Reorganization of the centrosome and associated microtubules during the morphogenesis of a mouse cochlear epithelial cell. *J. Cell Sci.*, **107** (Pt 2): 589–600.
- Henderson, C.G., Tucker, J.B., Mogensen, M.M., Mackie, J.B., Chaplin, M.a, Slepecky, N.B., and Leckie, L.M. 1995. Three microtubule-organizing centres collaborate in a mouse cochlear epithelial cell during supracellularly coordinated control of microtubule positioning. *J. Cell Sci.*, **108** (Pt 1): 37–50.
- Howes, S.C., Alushin, G.M., Shida, T., Nachury, M.V., and Nogales, E. 2014. Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure. *Mol. Biol. Cell*, **25**: 257–266.
- Ito, M., Spicer, S.S., and Schulte, B.a. 1995. Cytological changes related to maturation of the organ of Corti and opening of Corti's tunnel. *Hear. Res.*, **88**: 107–123.
- Janke, C. 2014. The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, functions. *J. Cell Biol.*, **206**: 461–472.
- Janke, C. and Montagnac, G. 2017. Causes and Consequences of Microtu-

**A**



**B**

	P2	P4	P30
Microtubules per IP	402	1348.5	3068
Microtubule density/ $\mu\text{m}^2$ (IP medial part)	8,88	55,66	173,56

**Figure S1 : Increase in the number and density of microtubules within the inner pillar cells of the hearing organ in mice.**

A. TEM view of inner pillar cells cut transversely in their median region at three stages of development (P2, P4, P30).

B. Mean number of microtubules within inner pillar cells and mean microtubule density per square micrometer of inner pillar cell at P2, P4 and P30.



## III | Discussion et conclusions

---

*We demand rigidly defined areas of doubt and uncertainty!*

— Douglas Adams,  
*The Hitchhiker's Guide to the Galaxy*



## 12 | Les deux étapes du développement de l'organe de Corti

Durant son développement, l'organe de l'audition des mammifères thériens, l'organe de Corti, subit une drastique évolution tant sur le plan morphologique que moléculaire. Notre travail nous a permis de mettre en évidence plusieurs éléments clés faisant intervenir les cellules de soutien (voir Table 1, page 160). Ces nouvelles données nous permettent de distinguer deux grandes étapes durant le développement de l'organe sensoriel auditif : la première étape correspond à la mise en place des différents types cellulaires qui composent l'organe de Corti ; la seconde étape constitue, quant à elle, un remodelage de la morphologie cellulaire qui modifie de façon conséquente l'architecture de l'organe de Corti et qui aura une grande influence sur le fonctionnement même de l'organe sensoriel.

### 12.1 Mise en place des cellules de l'organe de Corti

Cette première étape du développement de l'organe de l'audition commence par l'établissement du domaine prosensoriel au sein duquel seront issus les différents types cellulaires de l'organe de Corti (Driver et Kelley, 2020) (voir 4.2). L'apparition de ces derniers, peu après l'établissement du domaine prosensoriel, est un évènement relativement rapide (Kelley, 2007). En effet, nos observations montrent que chez le rat, à la base du canal cochléaire, l'ensemble des cellules de l'organe de Corti peut être distingué en moins de 48h. La grande majorité des études présente la cellule sensorielle interne comme étant la première cellule reconnaissable de l'organe de Corti (Driver et Kelley, 2020; Iizuka-Kogo,

2018; Romand *et al.*, 1993; Roux *et al.*, 2009). Ces résultats se basent essentiellement sur des critères morphologiques<sup>28</sup> ainsi que sur des marquages immunohistochimiques. Néanmoins, et contrairement à ce qui est habituellement décrit, la première cellule que nous distinguons correspond à la future cellule pilier interne. Cette cellule que nous distinguons à E16 chez le rat, soit presque 48h avant la première cellule sensorielle, a été identifiée grâce à l'utilisation d'une méthode cytochimique mettant en évidence les polysaccharides. Nous sommes les premiers à appliquer cette méthode sur des cochlées prélevées à un stade précoce du développement ; ce qui peut-être la raison pour laquelle nous sommes les seuls à obtenir actuellement ce résultat. Il serait intéressant d'analyser le rôle de ces polysaccharides qui s'accumulent dans les cellules piliers internes et d'évaluer leur éventuel rôle dans le développement de l'organe de l'audition<sup>29</sup>.

Après la détermination de la cellule sensorielle interne, le destin cellulaire des autres cellules de l'organe de l'audition serait médié en grande partie par la voie de signalisation Notch, par le phénomène d'inhibition latérale (Brooker *et al.*, 2006; Doetzlhofer *et al.*, 2009; Driver *et al.*, 2013; Kiernan *et al.*, 2005b; Lanford *et al.*, 1999; Murata *et al.*, 2006). Ce dernier permet ainsi l'alternance cellule sensorielle - cellule de soutien et l'établissement de la mosaïque de l'organe de Corti. Néanmoins, nous sommes interpellés par la position de la cellule pilier interne au sein de cette mosaïque : elle est en effet la seule à briser l'alternance cellule sensorielle - cellule de soutien. Une possible explication pourrait être l'existence d'un déplacement cellulaire qui s'opérerait durant les premiers stades de développement de cette cellule. Plusieurs études ont mis en évidence des déplacements des cellules de l'organe de Corti en développement à partir de E14 chez la souris. Ces mouvements, qui vont de pair avec la croissance du canal cochléaire et le phénomène d'extension convergente, permettent l'extrême régularité de la mosaïque par des mouvements cellulaires individuels mais également par l'application de forces de cisaillement engendrées par l'épithélium du sillon externe (Cohen *et al.*, 2020; Driver *et al.*, 2017). Ils seraient également à l'origine du positionnement caractéristique du prolongement filiforme des cellules de Deiters par rapport

---

<sup>28</sup>Telle que la présence d'une plaque cuticulaire par exemple (Romand *et al.*, 1993)

<sup>29</sup>La nature de ces polysaccharides a été étudiée au sein de notre laboratoire par plusieurs méthodes. Nous avons ainsi déterminé qu'il s'agissait de glycogène (ces données ne sont pas illustrées dans le présent manuscrit).

aux cellules sensorielles externes (voir 2.2.2.3). Néanmoins, si ces études, et les modélisations qui en découlent, montrent bien l'importance de ces mouvements cellulaires et des forces de cisaillement dans l'établissement de la mosaïque de l'organe de Corti, ils n'ont, en revanche, pas illustré de déplacement des futures cellules piliers internes pouvant expliquer l'alternance brisée décrite plus haut. Une autre explication pourrait être envisagée en changeant de paradigme : la future cellule pilier interne ferait office de point de départ dans l'établissement de la mosaïque, l'alternance cellule sensorielle - cellule de soutien rayonnant à partir de ce point central. Cette hypothèse pourrait être étayée par les expériences de Kelley et de ses collaborateurs (1995) qui montrent que l'ablation des cellules sensorielles internes à des stades précoces ne modifie pas le destin cellulaire des cellules adjacentes. D'autre part, de récentes recherches montrent que l'inhibition de  $Gsk3\beta$ , une sérine/thréonine kinase initialement découverte pour son rôle majeur dans la signalisation intracellulaire induite par l'insuline et pour son implication dans la voie Wnt/caténine- $\beta$ , conduit à la formation de cellules sensorielles internes surnuméraires (Munnamalai et Fekete, 2016; Petit-Paitel, 2010). De plus, exprimée dans la cellule pilier interne, elle serait également responsable de l'établissement des limites des domaines internes et externes de l'organe de Corti, et ce, sans intervention de la voie Wnt/caténine- $\beta$  (Ellis *et al.*, 2019). Le mécanisme par lequel ces limites sont fixées est encore inconnu. De plus amples analyses seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

## 12.2 Remodelage de l'organe de Corti

Le remodelage de l'organe de Corti prend place lorsque la différenciation des cellules qui le composent a été entamée et trouve son point culminant autour de la période d'ouverture des espaces intercellulaires, le tunnel de Corti et les espaces de Nuel. Plusieurs auteurs suggèrent le rôle important joué par ces espaces intercellulaires notamment dans la propagation des ondes sonores et leur amplification par les cellules sensorielles externes (Domenica Karavitaki et Mountain, 2007; Zagadou et Mountain, 2012).

Durant cette période, nous avons observé une EMT partielle, phénomène courant durant le développement des organismes (Thiery *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2007; Johansson et Grapin-Botton, 2002; Tanimizu et Miyajima, 2007) mais dont nous sommes les premiers à

le mettre en évidence au sein des cellules de soutien de l'organe de Corti. Une EMT permet aux cellules épithéliales de se mouvoir plus aisément au sein des tissus (Zeisberg et Neilson, 2009). Nous pouvons dès lors supposer que l'EMT partielle que nous observons joue un rôle facilitateur dans l'ouverture des différents espaces intercellulaires. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 6.2, l'activation et l'expression des facteurs de transcription induisant une EMT dépendent d'une pléthore de voies de signalisation telles que TGF- $\beta$ , BMP, EGF, FGF, PDGF, Wnt, Shh, Notch ou encore la signalisation médiée par les intégrines (Al Moustafa *et al.*, 2012; Espinoza et Miele, 2013; Heldin *et al.*, 2012; Katoh et Katoh, 2009; McCormack et O'Dea, 2013; Taipale et Beachy, 2001). De nombreuses analyses seront nécessaires afin d'évaluer l'implication de ces voies de signalisation dans l'EMT partielle que nous observons durant le développement de l'organe de Corti<sup>30</sup>. Néanmoins, selon une analyse transcriptomique réalisée aux stades postnataux chez la souris, les voies Wnt et Notch semblent être moins actives au sein des cellules de soutien entre P1 et P6. La voie de signalisation FGF semble en revanche augmenter en activité, comme en témoigne l'augmentation de l'expression de Fgfr3 durant la même période (Maass *et al.*, 2016). Il serait intéressant d'examiner son éventuelle implication dans l'EMT partielle que nous avons démontrée.

Participant au remodelage de la morphologie des cellules de soutien et donc à l'architecture générale de l'organe de l'audition, l'important cytosquelette composé par de nombreux faisceaux de microtubules comporte lui aussi son lot de modifications. Nous démontrons en effet une évolution dans la composition des différents isotypes de tubuline  $\beta$ . De plus, nous mettons pour la première fois en évidence l'apparition de la tubuline  $\beta$ 5 dans la cellule pilier interne, aux alentours de P6 chez le rat. Cette dernière observation est concomitante à la séparation des faisceaux de microtubules que nous avons également observée. Dès lors, nous suggérons que la tubuline  $\beta$ 5 pourrait jouer un rôle dans la subdivision des faisceaux de microtubules observée durant le développement de l'organe de Corti. Cette hypothèse est étayée par la sur-expression de la tubuline  $\beta$ 5 dans des cellules cancéreuses en culture qui

---

<sup>30</sup>Au sein de notre laboratoire, nous avons déjà exploré l'importance de vimentine durant cette EMT partielle par le biais d'une souris dont l'expression de la vimentine a été supprimée. Il apparaît que celle-ci n'est pas indispensable à la formation des espaces intercellulaires de l'organe de Corti et ce dernier se développe apparemment sans encombre. L'audition de ces souris a également été testée et aucun défaut n'a été observé (ces données ne sont pas illustrées dans le présent manuscrit).

mène à une désorganisation des faisceaux de microtubules ainsi qu'à leur détachement du centrosome (Bhattacharya et Cabral, 2004; Bhattacharya *et al.*, 2011). Si cette hypothèse s'avérait exacte, elle tendrait à montrer que chaque isotype de tubuline possède un rôle fonctionnel qui lui est propre.

C'est également autour de la période d'apparition de la tubuline  $\beta 5$  que les microtubules des cellules de soutien passent de 13 à 15 protofilament, fait unique chez les vertébrés. Ce cytosquelette de microtubules à 15 protofilaments entres lesquels sont insérés des microfilaments d'actine confère aux cellules de soutien une rigidité exceptionnelle : chez la gerbille, dans le tour médian de la cochlée, la rigidité d'une cellule pilier a été mesurée à  $1,1 \times 10^{10}$  kPa et celle d'une cellule de Deiters à  $1,07 \times 10^3$  kPa<sup>31</sup> (Tolomeo et Holley, 1997; Zagadou *et al.*, 2014a). Cette organisation à 15 protofilaments ne semble pas dépendre entièrement de l'acétylation de la tubuline  $\alpha$  comme c'est le cas chez *C. elegans* (Topalidou *et al.*, 2012). D'autres paramètres pourraient dès lors entrer en ligne de compte tels que d'autres modifications post-traductionnelles, la composition en isotopes de tubuline, ou encore l'association des microtubules avec les MAPs. Il a d'ailleurs été démontré que des MAPs telles que la kinésine ou la doublecortine jouaient un rôle important dans la formation et la maintenance des microtubules à 13 protofilaments (Akhmanova et Severin, 2004; Howes *et al.*, 2014; Moores *et al.*, 2004). Selon nous, il pourrait être très intéressant de vérifier si l'absence de tubuline  $\beta 5$  menait ou non à la constitution des microtubules à 15 protofilaments.

---

<sup>31</sup>Par comparaison, la rigidité d'une cellule sensorielle externe du tour médian de la cochlée de gerbille a été mesurée à 2,4 kPa (Zagadou *et al.*, 2014a).



## 13 | Conclusions et perspectives

Bien souvent, les recherches consacrées au développement de l'organe de Corti se concentrent sur les différentes modalités de la différenciation des cellules sensorielles, que ce soit par un biais cognitif ou par un choix délibéré parce que le sujet est plus attrayant à la publication. Il est vrai qu'il y a encore très peu de données concernant la différenciation des cellules de soutien, ce qui rend la tâche un peu plus ardue (Driver et Kelley, 2020). Néanmoins, le présent travail démontre l'importance de leur implication durant le développement de l'organe de Corti. Il pose ainsi de nouvelles questions auxquelles nous devons répondre si nous souhaitons comprendre les différents aspects du développement de l'organe de Corti et ouvrir la voie à son éventuelle régénération.

Nous sommes les premiers à démontrer la précocité de la différenciation de la cellule pilier interne par rapport aux autres types cellulaires, par l'utilisation d'un marqueur que nous sommes les seuls à utiliser. Si le rôle de ce polysaccharide marqué reste encore à déterminer précisément, on peut également se poser la question de son accumulation à un stade si précoce. Il pourrait peut-être refléter l'implication des mécanismes qui permettent le placement précis de la cellule pilier interne et de l'organe de Corti durant ses premières étapes du développement. Dans cette optique, il serait intéressant d'analyser plus finement le rôle de  $Gsk3\beta$  et plus particulièrement celui de sa forme active *versus* sa forme inactive.

Le rôle de l'EMT partielle que nous avons observée pour la première fois au sein des cellules de soutien reste également à élucider. Afin de vérifier son implication dans la plasticité de l'épithélium et dans l'ouverture des espaces intercellulaires, il pourrait être intéressant d'explorer la voie de signalisation FGF et son éventuel rôle dans l'initiation de cet EMT partielle. L'utilisation d'un système de développement postnatal *in vitro* inspiré par les travaux

de Hahn et de ses collaborateurs (2008) serait la voie royale pour cette étude, afin de maîtriser parfaitement les paramètres temporels et de dosage d'inhibiteurs, mais sa mise en place reste très compliquée.

Le rôle de la tubuline  $\beta 5$  au sein du cytosquelette des cellules de soutien pose également question. Est-ce que la tubuline  $\beta 5$  participe à la constitution des microtubules à 15 protofilaments? Notre hypothèse selon laquelle elle joue un rôle dans la subdivision des faisceaux de microtubules est-elle correcte? L'utilisation d'une souris mutante invalidée pour la tubuline  $\beta 5$  pourrait peut-être nous aider à répondre à ces interrogations.

Comme nous l'avons signalé plus haut, il n'existe encore que très peu de données sur les cellules de soutien de l'organe de Corti en regard des connaissances que nous avons sur les cellules sensorielles. Néanmoins, au fur et à mesure des découvertes, ces cellules apparaissent jouer un rôle prépondérant dans le développement et la mise en place de l'organe sensoriel de l'audition.





## IV | Bibliographie

---

*The Universe, as has been observed before, is an unsettlingly big place, a fact which for the sake of a quiet life most people tend to ignore.*

— Douglas Adams



- ABDOLAZIMI, Y., STOJANOVA, Z. et SEGIL, N. (2016). Selection of cell fate in the organ of Corti involves the integration of Hes/Hey signaling at the Atoh1 promoter. *Development*, 143(5):841–850.
- AHMED, S., LIU, C.-C. et NAWSHAD, A. (2007). Mechanisms of palatal epithelial seam disintegration by transforming growth factor (TGF) beta3. *Developmental biology*, 309(2):193–207.
- AKELLA, J. S., WLOGA, D., KIM, J., STAROSTINA, N. G., LYONS-ABBOTT, S., MORRISSETTE, N. S., DOUGAN, S. T., KIPREOS, E. T. et GAERTIG, J. (2010). MEC-17 is an  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase. *Nature*, 467(7312):218–222.
- AKHMANOVA, A. et SEVERIN, F. (2004). Thirteen Is the Lucky Number for Doublecortin. *Developmental Cell*, 7(1):5–6.
- AKHMANOVA, A. et STEINMETZ, M. O. (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(4):309–322.
- AKIL, O., OURSLER, A., FAN, K. et LUSTIG, L. (2016). Mouse Auditory Brainstem Response Testing. *Bio-Protocol*, 6(6).
- AL MOUSTAFA, A.-E., ACHKHAR, A. et YASMEEN, A. (2012). EGF-receptor signaling and epithelial-mesenchymal transition in human carcinomas. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 4(2):671–84.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. et WALTER, P. (2002). The Self-Assembly and Dynamic Structure of Cytoskeletal Filaments. In *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, 4th édition.
- ANGELBORG, C. et ENGSTRÖM, H. (1972). Supporting elements in the organ of Corti. I. Fibrillar structures in the supporting cells of the organ of Corti of mammals. *Acta oto-laryngologica. Supplementum*, 301:49–6.
- ANNIKO, M. (1983). Cyto-differentiation of cochlear hair cells. *American journal of otolaryngology*, 4(6):375–88.
- ANNIKO, M., THORNELL, L. E. et VIRTANEN, I. (1987). Cytoskeletal organization of the human inner ear. *Acta oto-laryngologica. Supplementum*, 437:5–76.
- ARNOLD, W. et ANNIKO, M. (1990). Expression of cyto-keratin-proteins in the human organ of corti and its functional significance. *Laryngo- Rhino- Otologie*, 69(1):24–30.
- ASSAD, J. A., SHEPHERD, G. M. et COREY, D. P. (1991). Tip-link integrity and mechanical transduction in vertebrate hair cells. *Neuron*, 7(6):985–994.
- AXELSSON, A. (1988). Comparative anatomy of cochlear blood vessels. *American Journal of Otolaryngology*, 9(6):278–290.
- BAGGER-SJÖBÄCK, D., BRODAL, A., COHEN, B., DOHLMAN, G. F., FREDRICKSON, J. M., GACEK, R. R., GERLANDT, B. E., KORNHUBER, H. H., LOWENSTEIN, O. E., MARKL, H., JONES, G. M., POMPEIANO, O., PRECHT, W., SCHWARZ, D. W. F. et WERSÄLL, J. (1974). *Vestibular System Part 1: Basic Mechanisms*, volume 6 / 1 de *Handbook of Sensory Physiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- BARALD, K. F. et KELLEY, M. W. (2004). From placode to polarization: new tunes in inner ear development. *Development*, 131(17):4119–4130.
- BASCH, M. L., BROWN, R. M., JEN, H. I. et GROVES, A. K. (2016a). Where hearing starts: The development of the mammalian cochlea. *Journal of Anatomy*, 228(2):233–254.
- BASCH, M. L., BROWN, R. M., JEN, H.-I., SEMERCI, F., DEPREUX, F., EDLUND, R. K., ZHANG, H., NORTON, C. R., GRIDLEY, T., COLE, S. E., DOETZLHOFFER, A., MALETIC-SAVATIC, M., SEGIL, N. et GROVES, A. K. (2016b). Fine-tuning of Notch signaling sets the boundary of the organ of Corti and establishes sensory cell fates. *eLife*, 5:e19921.
- BATTAGLIA, R. A., DELIC, S., HERRMANN, H. et SNIDER, N. T. (2018). Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000Research*, 7:1796.
- BAUWENS, L. J. J. M., VELDMAN, J. E., RAMAEKERS, F. C. S., BOUMAN, H. et HUIZING, E. H. (1991). Expression of Intermediate Filament Proteins in the Adult Human Cochlea. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 100(3):211–218.
- BEAR, M. F., CONNORS, B. W. et PARADISO, M. A. (2007). *Neuroscience Volume 2 : Exploring the Brain*. Neuroscience: Exploring the Brain. Lippincott Williams & Wilkins.
- BELYANTSEVA, I. A., BOGER, E. T. et FRIEDMAN, T. B. (2003). Myosin XVa localizes to the tips of inner ear sensory cell stereocilia and is essential for staircase formation of the hair bundle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24):13958–63.
- BERGLUND, A. M. et RYUGO, D. K. (1987). Hair cell innervation by spiral ganglion neurons in the mouse. *The Journal of comparative neurology*, 255:560–570.
- BERMINGHAM, N. A., HASSAN, B. A., PRICE, S. D., VOLLRATH, M. A., BEN-ARIE, N., EATOCK, R. A., BELLEN, H. J., LYSAKOWSKI, A. et ZOGHBI, H. Y. (1999). Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science*, 284(5421):1837–1841.
- BERMINGHAM-MCDONOGH, O., OESTERLE, E. C., STONE, J. S., HUME, C. R., HUYNH, H. M. et HAYASHI, T. (2006). Expression of Prox1 during mouse cochlear development. *The Journal of comparative neurology*, 496(2):172–86.
- BESSON, A. (2007). p27 Kip1, suppresseur de tumeur... et oncogène? *médecine/sciences*, 23(12):1089–1091.
- BEURG, M., EVANS, M. G., HACKNEY, C. M. et FETTIPLACE, R. (2006). A large-conductance calcium-selective mechanotransducer channel in mammalian cochlear hair cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(43):10992–1000.
- BEURG, M., FETTIPLACE, R., NAM, J.-H. et RICCI, A. J. (2009). Localization of inner hair cell mechanotransducer channels using high-speed calcium imaging. *Nature neuroscience*, 12(5):553–8.

## BIBLIOGRAPHIE

- BHABHA, G., JOHNSON, G. T., SCHROEDER, C. M. et VALE, R. D. (2016). How Dynein Moves Along Microtubules. *Trends in biochemical sciences*, 41(1):94–105.
- BHATTACHARYA, R. et CABRAL, F. (2004). A Ubiquitous  $\beta$ -tubulin Disrupts Microtubule Assembly and Inhibits Cell Proliferation. *Molecular Biology of the Cell*, 15(7):3123.
- BHATTACHARYA, R., YANG, H. et CABRAL, F. (2011). Class V  $\beta$ -tubulin alters dynamic instability and stimulates microtubule detachment from centrosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 22(7):1025–1034.
- BOHNE, B. A. et CARR, C. D. (1985). Morphometric analysis of hair cells in the chinchilla cochlea. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 77(1):153–8.
- BOHNENPOLL, T., TROWE, M.-O., WOJAHN, I., MARK TAKETO, M., PETRY, M. et KISPERT, A. (2014). Canonical Wnt signaling regulates the proliferative expansion and differentiation of fibrocytes in the murine inner ear. *Developmental biology*, pages 1–12.
- BOSC, C., CRONK, J. D., PIROLLET, F., WATTERSON, D. M., HAIECH, J., JOB, D. et MARGOLIS, R. L. (1996). Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(5):2125–30.
- BREDBERG, G. (1968). Cellular pattern and nerve supply of the human organ of Corti. *Acta oto-laryngologica*, pages Suppl 236:1+.
- BREUSKIN, I., BODSON, M., THELEN, N., THIRY, M., BORGS, L., NGUYEN, L., STOLT, C., WEGNER, M., LEFEBVRE, P. P. et MALGRANGE, B. (2010). Glial but not neuronal development in the cochleo-vestibular ganglion requires Sox10. *Journal of neurochemistry*, 114(6):1827–39.
- BREUSKIN, I., BODSON, M., THELEN, N., THIRY, M., NGUYEN, L., BELACHEW, S., LEFEBVRE, P. P. et MALGRANGE, B. (2008). Strategies to regenerate hair cells: identification of progenitors and critical genes. *Hearing research*, 236(1-2):1–10.
- BROOKER, R., HOZUMI, K. et LEWIS, J. (2006). Notch ligands with contrasting functions: Jagged1 and Delta1 in the mouse inner ear. *Development*, 133(7):1277–1286.
- BROWNELL, W. E., BADER, C. R., BERTRAND, D. et de RIBAUPIERRE, Y. (1985). Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science (New York, N.Y.)*, 227(4683):194–6.
- CABLE, J. et STEEL, K. P. (1991). Identification of two types of melanocyte within the stria vascularis of the mouse inner ear. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, 4(2):87–101.
- CARRARO, M., NEGANDHI, J., KUTHUBUTHEEN, J., PROPST, E. J., KUS, L., LIN, V. Y. W. et HARRISON, R. V. (2013). Attenuating Cardiac Pulsations within the Cochlea: Structure and Function of Tortuous Vessels Feeding Stria Vascularis. *ISRN Otolaryngology*, 2013:1–7.
- CHALFIE, M. (2009). Neurosensory mechanotransduction. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(1):44–52.
- CHALFIE, M. et THOMSON, J. N. (1982). Structural and functional diversity in the neuronal microtubules of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Cell Biology*, 93(1):15–23.
- CHEN, P. et SEGIL, N. (1999). p27(Kip1) links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Development (Cambridge, England)*, 126(8):1581–90.
- CHÈVREMONT, M. (1980). *Cytologie et Histologie II*. Desoer, Liège, 4th édition.
- CHU BOYANG, SNUSTAD, D. P. et CARTER, J. V. (1993). Alteration of beta-tubulin gene expression during low-temperature exposure in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 103(2):371–377.
- CLEVERS, H. (2006). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*, 127(3):469–480.
- CLOES, M., RENSON, T., JOHNSON, N., THELEN, N. et THIRY, M. (2013). Differentiation of Boettcher's cells during postnatal development of rat cochlea. *Cell and tissue research*, 354(3):707–16.
- COATE, T. M. et KELLEY, M. W. (2013). Making connections in the inner ear: Recent insights into the development of spiral ganglion neurons and their connectivity with sensory hair cells. *Seminars in cell & developmental biology*, pages 459–468.
- COHEN, R., AMIR-ZILBERSTEIN, L., HERSCH, M., WOLAND, S., LOZA, O., TAIBER, S., MATSUZAKI, F., BERGMANN, S., AVRAHAM, K. B. et SPRINZAK, D. (2020). Mechanical forces drive ordered patterning of hair cells in the mammalian inner ear. *Nature Communications*, 11(1):1–12.
- CONDE, C. et CÁ CERES, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(5):319–32.
- CONLEE, J. W., PARKS, T. N., SCHWARTZ, I. R. et CREEL, D. J. (1989). Comparative anatomy of melanin pigment in the stria vascularis. Evidence for a distinction between melanocytes and intermediate cells in the cat. *Acta oto-laryngologica*, 107(1-2):48–58.
- CONNER, W. E. et CORCORAN, A. J. (2012). Sound strategies: the 65-million-year-old battle between bats and insects. *Annual review of entomology*, 57:21–39.
- CORTI, A. (1851). Recherches sur l'organe de l'ouïe des mammifères. In von SEIBOLD, K. T. E., KÖLLIKER, A. et EHLERS, E. H., éditeurs : *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, numéro 3, page 109. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- COSGROVE, D., KORNAK, J. M. et SAMUELSON, G. (1996). Expression of basement membrane type IV collagen chains during postnatal development in the murine cochlea. *Hearing research*, 100(1-2):21–32.
- COSGROVE, D. et RODGERS, K. D. (1997). Expression of the major basement membrane-associated proteins during

- postnatal development in the murine cochlea. *Hearing research*, 105(1-2):159–70.
- COUJARD, R. et POIRIER, J. (1980). *Précis d'histologie humaine*. Presses Université Laval, Laval.
- COULOIGNER, V., STERKERS, O., RASK-ANDERSEN, H., TEIXEIRA, M. et FERRARY, E. (2004). Le sac endolymphatique : ses fonctions au sein de l'oreille interne. *médecine/sciences*, 20(3):304–310.
- CUEVA, J. G., HSIN, J., HUANG, K. C. et GOODMAN, M. B. (2012). Posttranslational Acetylation of  $\alpha$ -Tubulin Constrains Protofilament Number in Native Microtubules. *Current Biology*, 22(12):1066–1074.
- DABDOUB, A., PULIGILLA, C., JONES, J. M., FRITZSCH, B., CHEAH, K. S. E., PEVNY, L. H. et KELLEY, M. W. (2008). Sox2 signaling in prosensory domain specification and subsequent hair cell differentiation in the developing cochlea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105:18396–18401.
- D'AMICO-MARTEL, A. et NODEN, D. M. (1983). Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia. *The American journal of anatomy*, 166(4):445–468.
- DAVE, J. M. et BAYLESS, K. J. (2014). Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting. *Microcirculation*, 21(4):333–344.
- DAVIS, H. (1983). An active process in cochlear mechanics. *Hearing Research*, 9(1):79–90.
- DELPRAT, B., MICHEL, V., GOODYEAR, R., YAMASAKI, Y., MICHALSKI, N., EL-AMRAOUI, A., PERFETTINI, I., LEGRAIN, P., RICHARDSON, G., HARDELIN, J.-P. et PETIT, C. (2005). Myosin XVa and whirlin, two deafness gene products required for hair bundle growth, are located at the stereocilia tips and interact directly. *Human molecular genetics*, 14(3):401–10.
- DEY, P., TOGRA, J. et MITRA, S. (2014). Intermediate filament: Structure, function, and applications in cytology. *Diagnostic Cytopathology*, 42(7):628–635.
- DOETZLHOFER, A., BASCH, M. L., OHYAMA, T., GESSLER, M., GROVES, A. K. et SEGIL, N. (2009). Hey2 Regulation by FGF Provides a Notch-Independent Mechanism for Maintaining Pillar Cell Fate in the Organ of Corti. *Developmental Cell*, 16(1):58–69.
- DOMENICA KARAVITAKI, K. et MOUNTAIN, D. C. (2007). Evidence for Outer Hair Cell Driven Oscillatory Fluid Flow in the Tunnel of Corti. *Biophysical Journal*, 92(9):3284–3293.
- dos REMEDIOS, C. G., CHHABRA, D., KEKIC, M., DEDOVA, I. V., TSUBAKIHARA, M., BERRY, D. A. et NOSWORTHY, N. J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiological reviews*, 83(2):433–73.
- DOUARIN, N. L. (1980). *Neural Development Part II - Neural Development in Model Systems*, volume 16 de *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier.
- DREILING, F. J., HENSON, M. M. et HENSON, O. W. (2002). The presence and arrangement of type II collagen in the basilar membrane. *Hearing research*, 166(1-2):166–80.
- DRIVER, E. C. et KELLEY, M. W. (2009). Specification of cell fate in the mammalian cochlea. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 87(3):212–221.
- DRIVER, E. C. et KELLEY, M. W. (2020). Development of the cochlea. *Development (Cambridge)*, 147(12).
- DRIVER, E. C., NORTHROP, A. et KELLEY, M. W. (2017). Cell migration, intercalation and growth regulate mammalian cochlear extension. *Development (Cambridge)*, 144(20):3766–3776.
- DRIVER, E. C., SILLERS, L., COATE, T. M., ROSE, M. F., KELLEY, M. W., CARROLL DRIVER, E., SILLERS, L., COATE, T. M., ROSE, M. F., KELLEY, M. W., DRIVER, E. C., SILLERS, L., COATE, T. M., ROSE, M. F. et KELLEY, M. W. (2013). The Atoh1-lineage gives rise to hair cells and supporting cells within the mammalian cochlea. *Developmental Biology*, 376(1):86–98.
- DULGUEROV, P. et REMACLE, M. (2005). *Précis d'audiophonologie et de déglutition: Tome 1 – L'oreille et les voies de l'audition*. Collection Voix, parole, langage. De Boeck Supérieur.
- EATOCK, R. A. (2006). *Vertebrate Hair Cells*, volume 27 de *Springer Handbook of Auditory Research*. Springer-Verlag, New York.
- ELGOYHEN, A. B. et FRANCHINI, L. F. (2011). Prestin and the cholinergic receptor of hair cells: Positively-selected proteins in mammals. *Hearing Research*, 273(1-2):100–108.
- ELLIS, K., DRIVER, E. C., OKANO, T., LEMONS, A. et KELLEY, M. W. (2019). GSK3 regulates hair cell fate in the developing mammalian cochlea. *Developmental Biology*, 453(2):191–205.
- ENCYCLOPEDIA BRITANNICA (2019). <https://www.britannica.com/science/vestibular-system>.
- ENGSTRÖM, H. (1960). The cortilymph, the third lymph of the inner ear. *Acta morphologica Neerlando-Scandinavica*, 3:195–204.
- ERIKSSON, J. E., DECHAT, T., GRIN, B., HELFAND, B., MENDEZ, M., PALLARI, H.-M. et GOLDMAN, R. D. (2009). Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *Journal of Clinical Investigation*, 119(7):1763–1771.
- ESPINOZA, I. et MIELE, L. (2013). Deadly crosstalk: Notch signaling at the intersection of EMT and cancer stem cells. *Cancer letters*, 341(1):41–5.
- FAY, R. (1988). *Hearing in vertebrates : a psychophysics databook*. Hill-Fay Associates, Winnetka Ill.
- FELDHAMER, G. A. (2007). *Mammalogy: Adaptation, Diversity, Ecology*. Johns Hopkins University Press.
- FERRARY, E. et STERKERS, O. (1998). Mechanisms of endolymph secretion. *Kidney international. Supplement*, 65:98–103.
- FETTIPLACE, R. et HACKNEY, C. M. (2006). The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nat Rev Neurosci*, 7(1):19–29.
- FISCHER, W. H. et SCHÄFER, J. W. (1991). Direction-dependent amplification of the human outer ear. *British*

## BIBLIOGRAPHIE

- journal of audiology*, 25(2):123–30.
- FLETCHER, D. A. et MULLINS, R. D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280):485–92.
- FLOCK, A. et CHEUNG, H. C. (1977). Actin filaments in sensory hairs of inner ear receptor cells. *The Journal of cell biology*, 75(2 Pt 1):339–43.
- FORGE, A. et WRIGHT, T. (2002). The molecular architecture of the inner ear. *British medical bulletin*, 63:5–24.
- FRANKE, W. W., SCHMID, E., SCHILLER, D. L., WINTER, S., JARASCH, E. D., MOLL, R., DENK, H., JACKSON, B. W. et ILLMENSEE, K. (1982). Differentiation-related Patterns of Expression of Proteins of Intermediate-size Filaments in Tissues and Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 46:431–453.
- FRITZSCH, B. (1996). How does the urodele ear develop? *The International journal of developmental biology*, 40:763–771.
- FRITZSCH, B., BEISEL, K. W., PAULEY, S. et SOUKUP, G. (2007). Molecular evolution of the vertebrate mechanosensory cell and ear. *The International Journal of Developmental Biology*, 51(6-7):663–678.
- FRITZSCH, B., PAN, N., JAHAN, I., DUNCAN, J. S., KOPECKY, B. J., ELLIOTT, K. L., KERSIGO, J. et YANG, T. (2013). Evolution and development of the tetrapod auditory system: an organ of Corti-centric perspective. *Evolution & development*, 15(1):63–79.
- FRITZSCH, B., PAN, N., JAHAN, I. et ELLIOTT, K. L. (2015). Inner ear development: building a spiral ganglion and an organ of Corti out of unspecified ectoderm. *Cell and Tissue Research*, 361(1):7–24.
- FURNESS, D., KARKANEVATOS, A., WEST, B. et HACKNEY, C. (2002). An immunogold investigation of the distribution of calmodulin in the apex of cochlear hair cells. *Hearing Research*, 173(1-2):10–20.
- FURNESS, D. N. et HACKNEY, C. M. (2006). The Structure and Composition of the Stereociliary Bundle of Vertebrate Hair Cells. In EATOCK, R., FAY, R. et POPPER, A., éditeurs : *Vertebrate Hair Cells: Springer Handbook of Auditory Research Volume 27*, volume 27 de *Springer Handbook of Auditory Research*, pages 95–153. Springer-Verlag, New York.
- FURNESS, D. N., HACKNEY, C. M. et BENOS, D. J. (1996). The binding site on cochlear stereocilia for antisera raised against renal Na<sup>+</sup> channels is blocked by amiloride and dihydrostreptomycin. *Hearing Research*, 93(1-2): 136–146.
- GAMA-NORTON, L., FERRANDO, E., RUIZ-HERGUIDO, C., LIU, Z., GUIU, J., ISLAM, A. B. M. M. K., LEE, S.-U., YAN, M., GUIDOS, C. J., LÓPEZ-BIGAS, N., MAEDA, T., ESPINOSA, L., KOPAN, R. et BIGAS, A. (2015). Notch signal strength controls cell fate in the haemogenic endothelium. *Nature Communications*, 6(1):8510.
- GAN, Z., DING, L., BURCKHARDT, C. J., LOWERY, J., ZARITSKY, A., SITTERLEY, K., MOTA, A., COSTIGLIOLA, N., STARKER, C. G., VOYTAS, D. F., TYTELL, J., GOLDMAN, R. D. et DANUSER, G. (2016). Vimentin Intermediate Filaments Template Microtubule Networks to Enhance Persistence in Cell Polarity and Directed Migration. *Cell Systems*, 3(3):252–263.
- GARCIN, C. et STRAUBE, A. (2019). Microtubules in cell migration. *Essays in biochemistry*, 63(5):509–520.
- GARDNER, M. K., ZANIC, M. et HOWARD, J. (2013). Microtubule catastrophe and rescue. *Current opinion in cell biology*, 25(1):14–22.
- GÉLÉOC, G. S. G. et HOLT, J. R. (2003). Developmental acquisition of sensory transduction in hair cells of the mouse inner ear. *Nature neuroscience*, 6(10):1019–20.
- GIANCOLI, D. C. (1993). *Physique générale: Ondes, optique et physique moderne*. Physique générale. De Boeck Supérieur.
- GIESE, A. P. J., TANG, Y.-Q., SINHA, G. P., BOWL, M. R., GOLDRING, A. C., PARKER, A., FREEMAN, M. J., BROWN, S. D. M., RIAZUDDIN, S., FETTIPLACE, R., SCHAFER, W. R., FROLENKOV, G. I. et AHMED, Z. M. (2017). CIB2 interacts with TMC1 and TMC2 and is essential for mechanotransduction in auditory hair cells. *Nature Communications*, 8(1):43.
- GOLOVKINE, G., REBOUD, E. et HUBER, P. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* takes a multi-target approach to achieve junction breach. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(JAN):1–9.
- GONZALEZ, D. M. et MEDICI, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science Signaling*, 7(344):re8–re8.
- GRAVEN, S. N. et BROWNE, J. V. (2008). Auditory Development in the Fetus and Infant. *Newborn and Infant Nursing Reviews*, 8(4):187–193.
- GRILLET, N., XIONG, W., REYNOLDS, A., KAZMIERCZAK, P., SATO, T., LILLO, C., DUMONT, R. A., HINTERMANN, E., SZANIECKA, A., SCHWANDER, M., WILLIAMS, D., KACHAR, B., GILLESPIE, P. G. et MÜLLER, U. (2009). Harmonin mutations cause mechanotransduction defects in cochlear hair cells. *Neuron*, 62(3):375–87.
- GROTHER, B., CARR, C. E., CASSEDAY, J. H., FRITZSCH, B., KÖPPL, C., FAY, R. R., POPPER, A. N., NEURAL, T. et PATTERNS, P. (2004). The evolution of central pathways and their neural processing patterns. In MANLEY, G. A., POPPER, A. N. et FAY, R. R., éditeurs : *Evolution Of The Vertebrate Auditory System*, volume 22, pages 289–359. Springer.
- GU, S., OLSZEWSKI, R., NELSON, L., GALLEGO-MARTINEZ, A., LOPEZ-ESCAMEZ, J. A. et HOA, M. (2021). Identification of Potential Meniere's Disease Targets in the Adult Stria Vascularis. *Frontiers in Neurology*, 0:61.
- GULLEY, R. L. et REESE, T. S. (1976). Intercellular junctions in the reticular lamina of the organ of Corti. *Journal of neurocytology*, 5(4):479–507.
- HACKNEY, C. M. et FURNESS, D. N. (2013). The composition and role of cross links in mechano-electrical transduction in vertebrate sensory hair cells. *Journal of cell science*, 126(Pt 8):1721–31.

- HACKNEY, C. M., FURNESS, D. N., BENOS, D. J., WOODLEY, J. F. et BARRATT, J. (1992). Putative immunolocalization of the mechano-electrical transduction channels in mammalian cochlear hair cells. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 248(1323):215–21.
- HAHN, H., MÜLLER, M. et LÖWENHEIM, H. (2008). Whole organ culture of the postnatal sensory inner ear in simulated microgravity. *Journal of neuroscience methods*, 171(1):60–71.
- HALLWORTH, R. et LUDUEÑA, R. F. (2000). Differential expression of beta tubulin isoforms in the adult gerbil cochlea. *Hearing research*, 148(1-2):161–72.
- HALLWORTH, R., MCCOY, M. et POLAN-CURTAIN, J. (2000). Tubulin expression in the developing and adult gerbil organ of Corti. *Hear Res*, 139(1-2):31–41.
- HAREN INGRID BAZIN, L. et RÉMY, M.-H. (2006). NEDD1 et les complexes de nucléation des microtubules : recruter pour mieux organiser. *médecine/sciences*, 22(10):804–806.
- HARRISON, R. V. (2021). <https://lab.research.sickkids.ca/harrison/electron-microscopy/>.
- HE, D. Z. et DALLOS, P. (1999). Somatic stiffness of cochlear outer hair cells is voltage-dependent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14):8223–8228.
- HELDIN, C.-H., VANLANDEWIJCK, M. et MOUSTAKAS, A. (2012). Regulation of EMT by TGF $\beta$  in cancer. *FEBS letters*, 586(14):1959–70.
- HELFAND, B. T., MIKAMI, A., VALLEE, R. B. et GOLDMAN, R. D. (2002). A requirement for cytoplasmic dynein and dynactin in intermediate filament network assembly and organization. *Journal of Cell Biology*, 157(5):795–806.
- HENSEN, V. (1863). Zur Morphologie der Schnecke, des Menschen und der Säugetiere. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, Bd. 13.
- HERRMANN, H. et AEBI, U. (2016). Intermediate filaments: Structure and assembly. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(11).
- HERRMANN, H., STRELKOV, S. V., BURKHARD, P. et AEBI, U. (2009a). Intermediate filaments: Primary determinants of cell architecture and plasticity. *Journal of Clinical Investigation*, 119(7):1772–1783.
- HERRMANN, H., STRELKOV, S. V., BURKHARD, P. et AEBI, U. (2009b). Intermediate filaments: Primary determinants of cell architecture and plasticity.
- HILDING, D. A. et GINZBERG, R. D. (1977). Pigmentation of the stria vascularis. The contribution of neural crest melanocytes. *Acta oto-laryngologica*, 84(1-2):24–37.
- HILL, P. S. M. (2009). How do animals use substrate-borne vibrations as an information source? *Die Naturwissenschaften*, 96(12):1355–71.
- HOLLEY, M. C. et ASHMORE, J. F. (1990). Spectrin, actin and the structure of the cortical lattice in mammalian cochlear outer hair cells. *Journal of cell science*, 96 ( Pt 2):283–91.
- HOLLEY, M. C., KALINEC, F. et KACHAR, B. (1992). Structure of the cortical cytoskeleton in mammalian outer hair cells. *Journal of cell science*, 102 ( Pt 3):569–80.
- HOWES, S. C., ALUSHIN, G. M., SHIDA, T., NACHURY, M. V. et NOGALES, E. (2014). Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure. *Molecular biology of the cell*, 25(2):257–66.
- HUDSPETH, A. (2005). How the ear's works work: mechano-electrical transduction and amplification by hair cells. *Comptes Rendus Biologies*, 328(2):155–162.
- IIZUKA-KOGO, A. (2018). Spatiotemporal coordination of cellular differentiation and tissue morphogenesis in organ of Corti development. *Medical molecular morphology*, 51(2):65–81.
- ITO, M., SPICER, S. S. et SCHULTE, B. A. (1995). Cytological changes related to maturation of the organ of Corti and opening of Corti's tunnel. *Hearing research*, 88(1-2):107–23.
- JACQUES, B. E., PULIGILLA, C., WEICHERT, R. M., FERRER-VAQUER, A., HADJANTONAKIS, A.-K., KELLEY, M. W. et DABDOUB, A. (2012). A dual function for canonical Wnt/ -catenin signaling in the developing mammalian cochlea. *Development*, 139(23):4395–4404.
- JENSEN-SMITH, H. C., ELEY, J., STEYGER, P. S., LUDUEÑA, R. F. et HALLWORTH, R. (2003). Cell type-specific reduction of beta tubulin isoforms synthesized in the developing gerbil organ of Corti. *Journal of neurocytology*, 32(2): 185–97.
- JOHANSSON, K. A. et GRAPIN-BOTTON, A. (2002). Development and diseases of the pancreas. *Clinical genetics*, 62(1):14–23.
- JOHNEN, N., FRANCAERT, M.-E., THELEN, N., CLOES, M. et THIRY, M. (2012). Evidence for a partial epithelial-mesenchymal transition in postnatal stages of rat auditory organ morphogenesis. *Histochemistry and cell biology*, 138(3):477–88.
- JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J. et KELLEY, R. (1995). *Basic Histology*. Appleton & Lange, 8th intern édition.
- KALEBIC, N., SORRENTINO, S., PERLAS, E., BOLASCO, G., MARTINEZ, C. et HEPPENSTALL, P. A. (2013).  $\alpha$ TAT1 is the major  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase in mice. *Nature communications*, 4:1962.
- KALLURI, R. et WEINBERG, R. A. (2009). Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119.
- KALTENBACH, J. A. et FALZARANO, P. R. (1994). Postnatal development of the hamster cochlea. I. Growth of hair cells and the organ of Corti. *The Journal of Comparative Neurology*, 340(1):87–97.
- KATO, Y. et KATO, M. (2009). FGFR2-related pathogenesis and FGFR2-targeted therapeutics (Review). *International journal of molecular medicine*, 23(3):307–11.

## BIBLIOGRAPHIE

- KAZMIERCZAK, P., SAKAGUCHI, H., TOKITA, J., WILSON-KUBALEK, E. M., MILLIGAN, R. A., MÜLLER, U. et KACHAR, B. (2007). Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature*, 449(7158):87–91.
- KELLEY, M. W. (2006). Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(11):837–849.
- KELLEY, M. W. (2007). Cellular commitment and differentiation in the organ of Corti. *The International Journal of Developmental Biology*, 51(6-7):571–583.
- KELLEY, M. W. et BIANCHI, L. M. (2001). Development and neuronal innervation of the organ of Corti. In WILLOTT, J. F., éditeur : *Handbook of Mouse auditory research - From behavior to molecular biology*, Biological sciences, neuroscience, psychology, pages 137–157. Taylor & Francis, Boca Raton.
- KELLEY, M. W., DRIVER, E. C. et PULIGILLA, C. (2009). Regulation of cell fate and patterning in the developing mammalian cochlea. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 17(5):381–387.
- KELLEY, M. W., TALREJA, D. R. et CORWIN, J. T. (1995). Replacement of hair cells after laser microbeam irradiation in cultured organs of corti from embryonic and neonatal mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(4):3013–26.
- KELLEY, M. W., XU, X. M., WAGNER, M. a., WARCHOL, M. E. et CORWIN, J. T. (1993). The developing organ of Corti contains retinoic acid and forms supernumerary hair cells in response to exogenous retinoic acid in culture. *Development (Cambridge, England)*, 119(4):1041–53.
- KIANG, N. Y., RHO, J. M., NORTHROP, C. C., LIBERMAN, M. C. et RYUGO, D. K. (1982). Hair-cell innervation by spiral ganglion cells in adult cats. *Science (New York, N.Y.)*, 217(4555):175–7.
- KIERNAN, A., CORDES, R., KOPAN, R., GOSSLER, A. et GRIDLEY, T. (2005a). The Notch ligands DLL1 and JAG2 act synergistically to regulate hair cell development in the mammalian inner ear. *Development*, 132(19):4353–4362.
- KIERNAN, A., PELLING, A. L., LEUNG, K. K. H., TANG, A. S. P., BELL, D. M., TEASE, C., LOVELL-BADGE, R., STEEL, K. P. et CHEAH, K. S. E. (2005b). Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature*, 434(7036):1031–1035.
- KIERNAN, A., XU, J. et GRIDLEY, T. (2006). The Notch ligand JAG1 is required for sensory progenitor development in the mammalian inner ear. *PLoS Genet*, 2(1):e4.
- KIERNAN, A. E. (2013). Notch signaling during cell fate determination in the inner ear. *Seminars in cell & developmental biology*, 24(5):470–479.
- KIKUCHI, K. et HILDING, D. (1965). The Development of the Organ of Corti in the Mouse. *Acta Oto-laryngologica*, 60(1-6):207–221.
- KIKUCHI, K. et HILDING, D. A. (1966). The Development of the Stria Vascularis in the Mouse. *Acta Oto-laryngologica*, 62(1-6):277–291.
- KIKUCHI, T., ADAMS, J. C., MIYABE, Y., SO, E. et KOBAYASHI, T. (2000). Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Medical Electron Microscopy*, 33(2):51–56.
- KIKUCHI, T., TAKASAKA, T., TONOSAKI, A., KATORI, Y. et SHINKAWA, H. (1991). Microtubules of Guinea Pig Cochlear Epithelial Cells. *Acta Oto-Laryngologica*, 111(2):286–290.
- KIMURA, R. S. et SCHUKNECHT, H. F. (1970). The Ultrastructure of the Human Stria Vascularis. PART I. *Acta Oto-laryngologica*, 69(1-6):415–427.
- KIRJAVAINEN, A., SULG, M., HEYD, F., ALITALO, K., YLÄ-HERTTUALA, S., MÖRÖY, T., PETROVA, T. V. et PIRVOLA, U. (2008). Prox1 interacts with Atoh1 and Gfi1, and regulates cellular differentiation in the inner ear sensory epithelia. *Developmental Biology*, 322(1):33–45.
- KOELLIKER, A. (1879). *Entwicklungsgeschichte des Menschen und der höheren Thiere*. W. Engelmann, Leipzig.
- KÖLLIKER, A. (1854). *Mikroskopische Anatomie oder Gewebelehre des Menschen: Spezielle Gewebelehre. 1. Hälfte: Von den Verdauungs- und Respirationsorganen. 2. Hälfte: Von den Verdauungs-, Respirations-, Harn- und Geschlechtsorganen, vom Gefäßsystem und den höhern Sinnesorganen*. Numéro vol. 2, n° 2 de Mikroskopische Anatomie oder Gewebelehre des Menschen: Spezielle Gewebelehre. 1. Hälfte: Von den Verdauungs- und Respirationsorganen. 2. Hälfte: Von den Verdauungs-, Respirations-, Harn- und Geschlechtsorganen, vom Gefäßsystem und den höhern Sinnesorganen. Engelmann, Leipzig.
- KOMIYA, Y. et HABAS, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2):68–75.
- KORNREICH, M., AVINERY, R., MALKA-GIBOR, E., LASER-AZOGUI, A. et BECK, R. (2015). Order and disorder in intermediate filament proteins. *FEBS letters*, 589(19 Pt A):2464–76.
- KOZLOV, A. S., RISLER, T. et HUDSPETH, A. J. (2007). Coherent motion of stereocilia assures the concerted gating of hair-cell transduction channels. *Nature neuroscience*, 10(1):87–92.
- KRAUS, N. et CHANDRASEKARAN, B. (2010). Music training for the development of auditory skills. *Nature reviews. Neuroscience*, 11(8):599–605.
- KRSTIC, R. V. (1991). *Human Microscopic Anatomy: An Atlas for Students of Medicine and Biology*. Springer.
- KRYLOVA, O., MESSENGER, M. J. et SALINAS, P. C. (2000). Dishevelled-1 regulates microtubule stability: A new function mediated by glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *Journal of Cell Biology*, 151(1):83–93.
- KUIJPERS, W., TONNAER, E. L., PETERS, T. A. et RAMAEKERS, F. C. (1992). Developmentally-regulated coexpression of vimentin and cytokeratins in the rat inner ear. *Hearing research*, 62(1):1–10.

- LAMAS, V., ARÉVALO, J. C., JUIZ, J. M. et MERCHÁN, M. A. (2015). Acoustic input and efferent activity regulate the expression of molecules involved in cochlear micromechanics. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8(JAN):1–8.
- LAMMERDING, J., SCHULZE, P. C., TAKAHASHI, T., KOZLOV, S., SULLIVAN, T., KAMM, R. D., STEWART, C. L. et LEE, R. T. (2004). Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *Journal of Clinical Investigation*, 113(3):370–378.
- LANFORD, P. J., LAN, Y., JIANG, R., LINDSELL, C., WEINMASTER, G., GRIDLEY, T. et KELLEY, M. W. (1999). Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nat Genet*, 21(3):289–292.
- LANG, H., LI, M., KILPATRICK, L. A., ZHU, J., SAMUVEL, D. J., KRUG, E. L. et GODDARD, J. C. (2011). Sox2 Up-regulation and Glial Cell Proliferation Following Degeneration of Spiral Ganglion Neurons in the Adult Mouse Inner Ear. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 12(2):151–171.
- LEE, J. M., DEDHAR, S., KALLURI, R. et THOMPSON, E. W. (2006a). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of cell biology*, 172(7):973–81.
- LEE, Y.-S., LIU, F. et SEGIL, N. (2006b). A morphogenetic wave of p27Kip1 transcription directs cell cycle exit during organ of Corti development. *Development (Cambridge, England)*, 133(15):2817–2826.
- LEWIS, E. (2004). Appendix: Useful Concepts from Circuit Theory. In GEOFFREY A. MANLEY, Arthur N. Popper, R. R. F., éditeur : *Evolution of the Vertebrate Auditory System*. Springer Science & Business Media.
- LI, L. et YANG, X.-J. (2015). Tubulin acetylation: responsible enzymes, biological functions and human diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(22):4237–4255.
- LI, S., PRICE, S. M., CAHILL, H., RYUGO, D. K., SHEN, M. M. et XIANG, M. (2002). Hearing loss caused by progressive degeneration of cochlear hair cells in mice deficient for the Barhl1 homeobox gene. *Development*, 129(14):3523–3532.
- LIM, D. J. (1972). Fine Morphology of the Tectorial Membrane: Its Relationship to the Organ of Corti. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 96(3):199–215.
- LIM, D. J. (1986). Functional structure of the organ of Corti: a review. *Hearing research*, 22:117–46.
- LIM, D. J. et ANNICO, M. (1985). Developmental morphology of the mouse inner ear. A scanning electron microscopic observation. *Acta Otolaryngol Suppl*, 422:1–69.
- LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D. et DARNELL, J. (2000). The Dynamics of Actin Assembly. In *Molecular Cell Biology. 4th edition*, chapitre Section 18. W. H. Freeman, New York.
- LORENZI, A. et CHAIX, B. (2011). Qu'est-ce qu'un son? <http://www.cochlea.org/spe/son-generalites.html>.
- LUDUEÑA, R. F. (2013). A Hypothesis on the Origin and Evolution of Tubulin. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 302:41–185.
- MAASS, J. C., GU, R., CAI, T., WAN, Y. W., CANTELLANO, S. C., ASPRER, J. S., ZHANG, H., JEN, H. I., EDLUND, R. K., LIU, Z. et GROVES, A. K. (2016). Transcriptomic analysis of mouse cochlear supporting cell maturation reveals large-scale changes in Notch responsiveness prior to the onset of hearing. *PLoS ONE*, 11(12):1–26.
- MAEDA, R., KINDT, K. S., MO, W., MORGAN, C. P., ERICKSON, T., ZHAO, H., CLEMENS-GRISHAM, R., BARR-GILLESPIE, P. G. et NICOLSON, T. (2014). Tip-link protein protocadherin 15 interacts with transmembrane channel-like proteins TMC1 and TMC2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35):12907–12.
- MALGRANGE, B., THIRY, M., VAN DE WATER, T. R., NGUYEN, L., MOONEN, G. et LEFEBVRE, P. P. (2002). Epithelial supporting cells can differentiate into outer hair cells and Deiters' cells in the cultured organ of Corti. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 59(10):1744–57.
- MALMIERCA, M. S. et RYUGO, D. K. (2011). *Auditory System*. Academic Press.
- MAO, Y., REIPRICH, S., WEGNER, M. et FRITZSCH, B. (2014). Targeted Deletion of Sox10 by Wnt1-cre Defects Neuronal Migration and Projection in the Mouse Inner Ear. *PloS one*, 9(4):e94580.
- MAŠEK, J. et ANDERSSON, E. R. (2017). The developmental biology of genetic Notch disorders. *Development*, 144(10):1743–1763.
- MCCORMACK, N. et O'DEA, S. (2013). Regulation of epithelial to mesenchymal transition by bone morphogenetic proteins. *Cellular signalling*, 25(12):2856–62.
- MCGEE, J., GOODYEAR, R. J., MCMILLAN, D. R., STAUFFER, E. A., HOLT, J. R., LOCKE, K. G., BIRCH, D. G., LEGAN, P. K., WHITE, P. C., WALSH, E. J. et RICHARDSON, G. P. (2006). The very large G-protein-coupled receptor VLGR1: a component of the ankle link complex required for the normal development of auditory hair bundles. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(24):6543–53.
- MCKENZIE, E., KRUPIN, A. et KELLEY, M. W. (2004). Cellular growth and rearrangement during the development of the mammalian organ of Corti. *Dev Dyn*, 229(4):802–812.
- MELLAL, A. (2010). *Application pratique de l'anatomie humaine*. Numéro 2 de EPU, Éditions Publibook université. Publibook/Société des écrivains.
- MEZNI, I., GALICHON, P., BACHA, M. M., SFAR, I., HERTIG, A., GOUCHA, R., XU-DUBOIS, Y.-C., ABDERRAHIM, E., GORGI, Y., RONDEAU, E. et ABDALLAH, T. B. (2015). La transition épithélio-mésenchymateuse et la fibrose du transplant rénal. *médecine/sciences*, 31(1):68–74.
- MICHALSKI, N., MICHEL, V., BAHLOUL, A., LEFÈVRE, G., BARRAL, J., YAGI, H., CHARDENOUX, S., WEIL, D., MARTIN, P., HARDELIN, J.-P., SATO, M. et PETIT, C. (2007). Molecular characterization of the ankle-link complex in cochlear hair cells and its role in the hair bundle functioning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the*

## BIBLIOGRAPHIE

- Society for Neuroscience*, 27(24):6478–88.
- MICHEL, V., GOODYEAR, R. J., WEIL, D., MARCOTTI, W., PERFETTINI, I., WOLFRUM, U., KROS, C. J., RICHARDSON, G. P. et PETIT, C. (2005). Cadherin 23 is a component of the transient lateral links in the developing hair bundles of cochlear sensory cells. *Developmental Biology*, 280(2):281–294.
- MOGENSEN, M. M., HENDERSON, C. G., MACKIE, J. B., LANE, E. B., GARROD, D. R. et TUCKER, J. B. (1998). Keratin filament deployment and cytoskeletal networking in a sensory epithelium that vibrates during hearing. *Cell Motility*, 41(2):138–153.
- MOHAN, R. et JOHN, A. (2015). Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules. *IUBMB life*, 67(6):395–403.
- MONTCOUQUIOL, M. et KELLEY, M. W. (2003). Planar and vertical signals control cellular differentiation and patterning in the mammalian cochlea. *J Neurosci*, 23(28):9469–9478.
- MONTCOUQUIOL, M., SANS, N., HUSS, D., KACH, J., DICKMAN, J. D., FORGE, A., RACHEL, R. a., COPELAND, N. G., JENKINS, N. a., BOGANI, D., MURDOCH, J., WARCHOL, M. E., WENTHOLD, R. J. et KELLEY, M. W. (2006). Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(19):5265–75.
- MONTEALEGRE-Z, F., JONSSON, T., ROBSON-BROWN, K. A., POSTLES, M. et ROBERT, D. (2012). Convergent evolution between insect and mammalian audition. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6109):968–71.
- MOORE, K. L. et DALLEY, A. F. (2001). *Anatomie médicale: aspects fondamentaux et applications cliniques*. De Boeck.
- MOORES, C. A., PERDERISET, M., FRANCIS, F., CHELBY, J., HOUDUSSE, A. et MILLIGAN, R. A. (2004). Mechanism of Microtubule Stabilization by Doublecortin. *Molecular Cell*, 14(6):833–839.
- MORALEE, S. J. (1996). Rosenthal and the spiral canal of the modiolus. *The American journal of otology*, 17(1):171.
- MORAVEC, W. J. et PETERSON, E. H. (2004). Differences between stereocilia numbers on type I and type II vestibular hair cells. *Journal of neurophysiology*, 92(5):3153–60.
- MORSILI, H., CHOO, D., RYAN, A., JOHNSON, R. et WU, D. K. (1998). Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(9):3327–35.
- MU, M. Y., CHARDIN, S., AVAN, P. et ROMAND, R. (1997). Ontogenesis of rat cochlea. A quantitative study of the organ of Corti. *Brain Res Dev Brain Res*, 99(1):29–37.
- MUNNAMALAI, V. et FEKETE, D. M. (2016). Notch-Wnt-Bmp crosstalk regulates radial patterning in the mouse cochlea in a spatiotemporal manner. *Development*, 143(21):4003–4015.
- MUÑOZ-LASSO, D. C., ROMÁ-MATEO, C., PALLARDÓ, F. V. et GONZALEZ-CABO, P. (2020). Much More Than a Scaffold: Cytoskeletal Proteins in Neurological Disorders. *Cells*, 9(2):358.
- MURATA, J., OHTSUKA, T., TOKUNAGA, A., NISHIIKE, S., INOHARA, H., OKANO, H. et KAGEYAMA, R. (2009). Notch-Hes1 pathway contributes to the cochlear prosensory formation potentially through the transcriptional down-regulation of p27Kip1. *Journal of neuroscience research*, 87(16):3521–34.
- MURATA, J., TOKUNAGA, A., OKANO, H. et KUBO, T. (2006). Mapping of notch activation during cochlear development in mice: implications for determination of prosensory domain and cell fate diversification. *The Journal of comparative neurology*, 497(3):502–18.
- NAYAK, G., GOODYEAR, R. J., LEGAN, P. K., NODA, M. et RICHARDSON, G. P. (2011). Evidence for multiple, developmentally regulated isoforms of Ptpqr on hair cells of the inner ear. *Developmental neurobiology*, 71(2):129–41.
- NAYAK, G. D., RATNAYAKA, H. S. K., GOODYEAR, R. J. et RICHARDSON, G. P. (2007). Development of the hair bundle and mechanotransduction. *The International journal of developmental biology*, 51(6-7):597–608.
- NEVES, J., UCHIKAWA, M., BIGAS, A. et GIRALDEZ, F. (2012). The prosensory function of Sox2 in the chicken inner ear relies on the direct regulation of Atoh1. *PloS one*, 7(1):e30871.
- NEVES, J., VACHKOV, I. et GIRALDEZ, F. (2013). Sox2 regulation of hair cell development: incoherence makes sense. *Hearing Research*, 297(November):20–29.
- NIETO, M. A. (2013). Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6159):1234850.
- NIH NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (2019). <https://medlineplus.gov/ency/imagepages/1092.htm>.
- NOGALES, E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annual review of biochemistry*, 69:277–302.
- NOGALES, E. et WANG, H.-W. (2006). Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: how and why? *Current opinion in cell biology*, 18(2):179–84.
- NOGALES, E., WHITTAKER, M., MILLIGAN, R. A. et DOWNING, K. H. (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell*, 96(1):79–88.
- NORAMLY, S. et GRAINGER, R. M. (2002). Determination of the embryonic inner ear. *Journal of neurobiology*, 53:100–128.
- OESTERLE, E. C., SARTHY, P. V. et RUBEL, E. W. (1990). Intermediate filaments in the inner ear of normal and experimentally damaged guinea pigs. *Hearing Research*, 47(1-2):1–16.
- OHYAMA, T., BASCH, M. L., MISHINA, Y., LYONS, K. M., SEGIL, N. et GROVES, A. K. (2010). BMP signaling is necessary for patterning the sensory and nonsensory regions of the developing mammalian cochlea. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(45):15044–51.
- OKORUWA, O. O. E., WESTON, M. M. D., SANJEEVI, D. C., MILLEMON, A. R., FRITZSCH, B., HALLWORTH, R. et

- BEISEL, K. W. (2008). Evolutionary insights into the unique electromotility motor of mammalian outer hair cells. *Evolution & development*, 10(3):336–346.
- OLSON, E. S. (1999). Direct measurement of intra-cochlear pressure waves. *Nature*, 402(6761):526–9.
- OSSIANNILSSON, F. (1949). Insect drummers, a study on the morphology and function of the sound producing organ of Swedish Homoptera Auchenorrhyncha, with notes on their sound-production. In *Opuscula entomologica. Supplementum*, volume 10. Entomologiska sällskapet i Lund, Lund.
- PACK, A. K. et SLEPECKY, N. B. (1995). Cytoskeletal and calcium-binding proteins in the mammalian organ of Corti: cell type-specific proteins displaying longitudinal and radial gradients. *Hearing research*, 91(1-2):119–35.
- PAN, B., GÉLÉOC, G. S., ASAI, Y., HORWITZ, G. C., KURIMA, K., ISHIKAWA, K., KAWASHIMA, Y., GRIFFITH, A. J. et HOLT, J. R. (2013). TMC1 and TMC2 Are Components of the Mechanotransduction Channel in Hair Cells of the Mammalian Inner Ear. *Neuron*, 79(3):504–515.
- PATEL, S., ALAM, A., PANT, R. et CHATTOPADHYAY, S. (2019). Wnt Signaling and Its Significance Within the Tumor Microenvironment: Novel Therapeutic Insights. *Frontiers in Immunology*, 10(December).
- PEARSON, A., JACOBSON, A., VAN CALCAR, R. et SAUTER, R. (1973). *The Development of the Ear*. American Academy for Ophthalmology and Oto-laryngology, Rochester, NY.
- PETERSON, E. H., COTTON, J. R. et GRANT, J. W. (1996). Structural variation in ciliary bundles of the posterior semicircular canal. Quantitative anatomy and computational analysis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 781(1):85–102.
- PETIT, C. (2003). Mécanismes d'analyse des fréquences sonores. <http://www.college-de-france.fr/site/christine-petit>.
- PETIT, C. (2009a). Introduction à la transduction mécano-électrique auditive. [http://www.college-de-france.fr/media/christine-petit/UPL49437\\_cpetit0203.pdf](http://www.college-de-france.fr/media/christine-petit/UPL49437_cpetit0203.pdf).
- PETIT, C. (2009b). Traitement des signaux acoustiques : de la cellule sensorielle auditive au complexe olivaire supérieur. [https://www.college-de-france.fr/media/christine-petit/UPL49452\\_C\\_Petit\\_cours\\_0708.pdf](https://www.college-de-france.fr/media/christine-petit/UPL49452_C_Petit_cours_0708.pdf).
- PETIT-PAITEL, A. (2010). GSK-3 $\beta$  : une kinase au cœur des maladies neuro-dégénératives? *médecine/sciences*, 26(5):516–521.
- PICKLES, J., COMIS, S. et OSBORNE, M. (1984). Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. *Hearing Research*, 15(2):103–112.
- PIRVOLA, U., ZHANG, X., MANTELA, J., ORNITZ, D. M. et YLIKOSKI, J. (2004). Fgf9 signaling regulates inner ear morphogenesis through epithelial-mesenchymal interactions. *Developmental biology*, 273(2):350–60.
- PLOUHINEC, J.-L. et TAELEMAN, V. (2011). Les contes de la voie Wnt. *Médecine/Sciences*, 27(12):1058–1061.
- POLLARD, T. D. (2016). Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(8).
- POLLICE, P. A. et BROWNELL, W. E. (1993). Characterization of the outer hair cell's lateral wall membranes. *Hearing research*, 70(2):187–96.
- PORCELLINI, A. (2009). Regenerative medicine: a review. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 31(SUPPL. 2):63–66.
- PUJOL, R. (1990). Neurobiologie de la cochlée. *médecine/sciences*, 6(5):456.
- PUJOL, R. et HILDING, D. (1973). Anatomy and physiology of the onset of auditory function. *Acta oto-laryngologica*, 76(1):1–10.
- PUJOL, R., LAVIGNE-REBILLARD, M. et LENOIR, M. (1998). Development of Sensory and Neural Structures in the Mammalian Cochlea. In RUBEL, E., POPPER, A. et FAY, R., éditeurs : *Development of the Auditory System SE - 4*, volume 9 de *Springer Handbook of Auditory Research*, pages 146–192. Springer New York.
- PULIGILLA, C., FENG, F., ISHIKAWA, K., BERTUZZI, S., DABDOUB, A., GRIFFITH, A. J., FRITZSCH, B. et KELLEY, M. W. (2007). Disruption of fibroblast growth factor receptor 3 signaling results in defects in cellular differentiation, neuronal patterning, and hearing impairment. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 236(7):1905–17.
- PULIGILLA, C. et KELLEY, M. W. (2017). Dual role for Sox2 in specification of sensory competence and regulation of Atoh1 function. *Developmental Neurobiology*, 77(1):3–13.
- PURVES, D. et COQUERY, J. M. (2005). *Neurosciences*. Neurosciences et cognition. De Boeck Supérieur.
- PURVES, D., FITZPATRICK, D., KATZ, L. C., LAMANTIA, A. S., MCNAMARA, J. O., WILLIAMS, S. M. et AUGUSTINE, G. J. (2001). *Neuroscience*. Sinauer Associates.
- QIAN, D., JONES, C., RZADZINSKA, A., MARK, S., ZHANG, X., STEEL, K. P., DAI, X. et CHEN, P. (2007). Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Developmental Biology*, 306(1):121–133.
- RAFF, E. C. (1997). Microtubule Architecture Specified by a beta-Tubulin Isoform. *Science*, 275(5296):70–73.
- RANDALL, D. J., BURGREN, W. et FRENCH, K. (1997). *Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*. W. H. Freeman and Company, 4th édition.
- RAPHAEL, Y. et ALTSCHULER, R. A. (2003). Structure and innervation of the cochlea. *Brain research bulletin*, 60(5-6):397–422.
- RAPHAEL, Y., LENOIR, M., WROBLEWSKI, R. et PUJOL, R. (1991). The sensory epithelium and its innervation in the mole rat cochlea. *The Journal of comparative neurology*, 314(2):367–82.
- REPRESA, J. J., MORO, J. A., GATO, A., PASTOR, F. et BARBOSA, E. (1990). Patterns of epithelial cell death during early development of the human inner ear. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 99(6 Pt 1):482–8.

## BIBLIOGRAPHIE

- RETZIUS, G. (1884). *Das Gehörorgan der Wirbeltiere: II. Das Gehörorgan der Amnioten*. Samson und Wallin, Stockholm.
- RICHARDSON, G., RUSSELL, I., DUANCE, V. et BAILEY, A. (1987). Polypeptide composition of the mammalian tectorial membrane. *Hearing Research*, 25(1):45–60.
- RIDLEY, A. J. (2011). Life at the leading edge. *Cell*, 145(7):1012–22.
- ROMAND, R., ZINE, A.-E. et HAFIDI, A. (1993). Ontogenesis of F-actin in hair cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 25(3):213–222.
- RONDAL, J. A. et SERON, X. (2000). *Troubles du langage: bases théoriques, diagnostic et rééducation*. Editions Mardaga.
- ROTH, B. et BRUNS, V. (1992a). Postnatal development of the rat organ of Corti - II. Hair cell receptors and their supporting elements. *Anatomy and Embryology*, 185(6):571–581.
- ROTH, B. et BRUNS, V. (1992b). Postnatal development of the rat organ of Corti. I. General morphology, basilar membrane, tectorial membrane and border cells. *Anatomy and embryology*, 185(6):559–69.
- ROUX, I., HOSIE, S., JOHNSON, S. L., BAHLOUL, A., CAYET, N., NOUAILLE, S., KROS, C. J., PETIT, C. et SAFIEDDINE, S. (2009). Myosin VI is required for the proper maturation and function of inner hair cell ribbon synapses. *Human Molecular Genetics*, 18(23):4615–4628.
- RUBEL, E. E. W. (1978). Ontogeny of Structure and Function in the Vertebrate Auditory System. In JACOBSON, M., éditeur : *Development of sensory systems*, volume 9 de *Handbook of Sensory Physiology*, pages 135–237. Springer Berlin Heidelberg.
- RUBEL, E. W. et FRITZSCH, B. (2002). Auditory system development: primary auditory neurons and their targets. *Annual review of neuroscience*, 25:51–101.
- RUBEN, R. J. (1967). Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses. *Acta Otolaryngol*, pages Suppl 220:1–Suppl 22044.
- RUEDA, J., CANTOS, R. et LIM, D. J. (1996). Tectorial membrane-organ of Corti relationship during cochlear development. *Anatomy and embryology*, 194:501–514.
- RUEDA, J., PRIETO, J. J., RUBIO, M. E., GUTIÉRREZ, A. et MERCHÁN, J. A. (1993). Development of the tectal cells in the mouse cochlea. *Anatomy and embryology*, 187(5):425–32.
- RÜSCH, a., LYSAKOWSKI, A., EATOCK, R. A. et RUSCH, A. (1998). Postnatal development of type I and type II hair cells in the mouse utricle: acquisition of voltage-gated conductances and differentiated morphology. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(18):7487–7501.
- RYUGO, D. K., DODDS, L. W., BENSON, T. E. et KIANG, N. Y. (1991). Unmyelinated axons of the auditory nerve in cats. *The Journal of comparative neurology*, 308:209–223.
- RZADZINSKA, A. K., NEVALAINEN, E. M., PROSSER, H. M., LAPPALAINEN, P. et STEEL, K. P. (2009). Myosin VIIa interacts with Twinfilin-2 at the tips of mechanosensory stereocilia in the inner ear. *PLoS one*, 4(9):e7097.
- SAFIEDDINE, S., EL-AMRAOUI, A. et PETIT, C. (2012). The auditory hair cell ribbon synapse: from assembly to function. *Annual review of neuroscience*, 35:509–28.
- SAILLOUR, Y., BROIX, L., BRUEL-JUNGERMAN, E., LEBRUN, N., MURACA, G., RUCCI, J., POIRIER, K., BELVINDRAH, R., FRANCIS, F. et CHELLY, J. (2014). Beta tubulin isoforms are not interchangeable for rescuing impaired radial migration due to Tubb3 knockdown. *Human Molecular Genetics*, 23(6):1516–1526.
- SAKUMA, H. (1998). Regional variations of the cytokeratin expression along the guinea pig cochlear turn. *Nippon Jibiinkoka Gakkai kaiho*, 101(11):1348–1357.
- SANTI, P. A., LARSON, J. T., FURCHT, L. T. et ECONOMOU, T. S. (1989). Immunohistochemical localization of fibronectin in the chinchilla cochlea. *Hearing research*, 39(1-2):91–101.
- SATO, M., LEAKE, P. A. et HRADEK, G. T. (1999). Postnatal development of the organ of Corti in cats: A light microscopic morphometric study. *Hearing Research*, 127:1–13.
- SAVAGE, C., HAMELIN, M., CULOTTI, J. G., COULSON, A., ALBERTSON, D. G. et CHALFIE, M. (1989). mec-7 is a beta-tubulin gene required for the production of 15-protofilament microtubules in *Caenorhabditis elegans*. *Genes & development*, 3(6):870–81.
- SAVAGNER, P. (2010). The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Annals of Oncology*, 21(SUPPL. 7):vii89–vii92.
- SCHICK, B., STARLINGER, V., HÄBERLE, L., EIGENTHALER, M., WALTER, U. et KNIPPER, M. (2007). Delayed formation of actin filaments in the outer pillar head plate of VASP<sup>-/-</sup> mice. *Cells Tissues Organs*, 184(2):88–95.
- SCHOFFENIELS, E. et MOONEN, G. (1993). *Physiologie des régulations*. Masson, Paris.
- SENFEN, M. (2006). Physical and Functional Interaction between Protocadherin 15 and Myosin VIIa in Mechanosensory Hair Cells. *Journal of Neuroscience*, 26(7):2060–2071.
- SHER, A. E. (1971). The embryonic and postnatal development of the inner ear of the mouse. *Acta Otolaryngol Suppl*, 285:1–77.
- SHI, F., HU, L., JACQUES, B. E., MULVANEY, J. E., DABDOUB, A. et EDGE, A. S. B. (2014).  $\beta$ -Catenin is required for hair-cell differentiation in the cochlea. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(19):6470–9.
- SIMONNEAU, L., GALLEGO, M. et PUJOL, R. (2003). Comparative expression patterns of T-, N-, E-cadherins, beta-catenin, and polysialic acid neural cell adhesion molecule in rat cochlea during development: implications for

- the nature of Kölliker's organ. *The Journal of comparative neurology*, 459(2):113–26.
- SJÖQVIST, M. et ANDERSSON, E. R. (2017). Do as I say, Not(ch) as I do: Lateral control of cell fate. *Developmental biology*.
- SLEPECKY, N. B., HENDERSON, C. G. et SAHA, S. (1995). Post-translational modifications of tubulin suggest that dynamic microtubules are present in sensory cells and stable microtubules are present in supporting cells of the mammalian cochlea. *Hear Res*, 91(1-2):136–147.
- SLEPECKY, N. B., SAVAGE, J. E. et YOO, T. J. (1992). Localization of type II, IX and V collagen in the inner ear. *Acta oto-laryngologica*, 112(4):611–7.
- SOBIN, A. et FLOCK, A. (1983). Immunohistochemical identification and localization of actin and fimbrin in vestibular hair cells in the normal guinea pig and in a strain of the waltzing guinea pig. *Acta oto-laryngologica*, 96(5-6):407–12.
- SOLOMON, K. S. et FRITZ, A. (2002). Concerted action of two dlx paralogs in sensory placode formation. *Development (Cambridge, England)*, 129:3127–3136.
- SOUTER, M. et FORGE, A. (1998). Intercellular junctional maturation in the stria vascularis: possible association with onset and rise of endocochlear potential. *Hearing Research*, 119(1-2):81–95.
- SOUTER, M., NEVILL, G. et FORGE, A. (1997). Postnatal maturation of the organ of Corti in gerbils: Morphology and physiological responses. *The Journal of Comparative Neurology*, 386(4):635–651.
- SPICER, S. S., THOMOPOULOS, G. N. et SCHULTE, B. a. (2000). Structural evidence for ion transport and tectorial membrane maintenance in the gerbil limbus. *Hearing research*, 143(1-2):147–61.
- SPOENDLIN, H. (1969). Innervation patterns in the organ of corti of the cat. *Acta oto-laryngologica*, 67(2):239–54.
- STEEL, K. P. (1983). The tectorial membrane of mammals. *Hearing Research*, 9(3):327–359.
- STEYGER, P., FURNESS, D., HACKNEY, C. et RICHARDSON, G. (1989). Tubulin and microtubules in cochlear hair cells: Comparative immunocytochemistry and ultrastructure. *Hearing Research*, 42(1):1–16.
- STEYGER, P. S., GILLESPIE, P. G. et BAIRD, R. A. (1998). Myosin Ibeta is located at tip link anchors in vestibular hair bundles. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(12):4603–15.
- STYERS, M. L., KOWALCZYK, A. P. et FAUNDEZ, V. (2005). Intermediate Filaments and Vesicular Membrane Traffic: The Odd Couple's First Dance? *Traffic*, 6(5):359–365.
- SVITKINA, T. M., VERKHOVSKY, A. B. et BORISY, G. G. (1996). Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *Journal of Cell Biology*, 135(4):991–1007.
- SWANSON, G. J., HOWARD, M. et LEWIS, J. (1990). Epithelial autonomy in the development of the inner ear of a bird embryo. *Developmental biology*, 137(2):243–57.
- SWARTZ, D. J. et SANTI, P. A. (1999). Immunolocalization of tenascin in the chinchilla inner ear. *Hearing research*, 130(1-2):108–14.
- SZARAMA, K. B., GAVARA, N., PETRALIA, R. S., KELLEY, M. W. et CHADWICK, R. S. (2012). Cytoskeletal changes in actin and microtubules underlie the developing surface mechanical properties of sensory and supporting cells in the mouse cochlea. *Development*, 139(12):2187–2197.
- TAIPALE, J. et BEACHY, P. A. (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, 411(6835):349–54.
- TANIMIZU, N. et MIYAJIMA, A. (2007). Molecular mechanism of liver development and regeneration. *International review of cytology*, 259:1–48.
- TANNENBAUM, J. et SLEPECKY, N. B. (1997). Localization of microtubules containing posttranslationally modified tubulin in cochlear epithelial cells during development. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 38(2):146–162.
- THALMANN, I. (1993). Collagen of accessory structures of organ of Corti. *Connective tissue research*, 29(3):191–201.
- THEVENEAU, E. et DAVID, N. (2014). Migrations cellulaires collectives. *médecine/sciences*, 30(8-9):751–757.
- THEVENEAU, E. et MAYOR, R. (2012). Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. *Current opinion in cell biology*, 24(5):677–84.
- THIERY, J. P. (1967). Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie*, 6:987–1018.
- THIERY, J. P., ACLOQUE, H., HUANG, R. Y. et NIETO, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5):871–890.
- THIERY, J.-P., CHUA, K., JING SIM, W. et HUANG, R. (2010). La transition épithéliomésenchymateuse au cours du développement dans la fibrose et dans la progression tumorale. *Bulletin du Cancer*, 97(11):1285–1295.
- THIRY, M., ANTOINE, N., CAUDROY, S., DEFAWEUX, V., RIGO, P. et THELEN, N. (2019). *Histologie générale - Exercices et méthodes*. DUNOD.
- THORN, L., ARNOLD, W., SCHINKO, I. et WETZSTEIN, R. (1978). [Light and electron microscopic studies of the greater epithelial ridge and its relationship to the developing tectorial membrane in the cochlear duct of the guinea pig (author's transl)]. *Arch Otorhinolaryngol*, 221(2):123–133.
- TI, S.-C., ALUSHIN, G. M. et KAPOOR, T. M. (2018). Human  $\beta$ -Tubulin Isoforms Can Regulate Microtubule Protofilament Number and Stability. *Developmental Cell*, 47(2):175–190.
- TOIVOLA, D., STRNAD, P., HABTEZION, A. et OMARY, M. (2010). Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends in Cell Biology*, 20(2):79–91.

## BIBLIOGRAPHIE

- TOLOMEO, J. A. et HOLLEY, M. C. (1997). Mechanics of microtubule bundles in pillar cells from the inner ear. *Biophysical journal*, 73(4):2241–7.
- TOPALIDOU, I., KELLER, C., KALEBIC, N., NGUYEN, K. C. Q., SOMHEGYI, H., POLITI, K. A., HEPPENSTALL, P., HALL, D. H. et CHALFIE, M. (2012). Genetically separable functions of the MEC-17 tubulin acetyltransferase affect microtubule organization. *Current biology : CB*, 22(12):1057–65.
- TORRES, M. et GIRÁLDEZ, F. (1998). The development of the vertebrate inner ear. *Mechanisms of development*, 71(1-2):5–21.
- TROWE, M.-O., MAIER, H., SCHWEIZER, M. et KISPERT, A. (2008). Deafness in mice lacking the T-box transcription factor Tbx18 in otic fibrocytes. *Development (Cambridge, England)*, 135(9):1725–34.
- TUCKER, J. B., PATON, C. C., HENDERSON, C. G. et MOGENSEN, M. M. (1993). Microtubule rearrangement and bending during assembly of large curved microtubule bundles in mouse cochlear epithelial cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 25(1):49–58.
- TUCKER, J. B., PATON, C. C., RICHARDSON, G. P., MOGENSEN, M. M. et RUSSELL, I. J. (1992). A cell surface-associated centrosomal layer of microtubule-organizing material in the inner pillar cell of the mouse cochlea. *Journal of cell science*, 102 ( Pt 2):215–26.
- VAGO, P., RIPOLL, C., TOURNEBIZE, R. et LENOIR, M. (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.
- VAN LAER, L., COUCKE, P., MUELLER, R. F., CAETHOVEN, G., FLOTHMANN, K., PRASAD, S. D., CHAMBERLIN, G. P., HOUSEMAN, M., TAYLOR, G. R., Van de HEYNING, C. M., FRANSEN, E., ROWLAND, J., CUCCI, R. A., SMITH, R. J. et VAN CAMP, G. (2001). A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *Journal of medical genetics*, 38:515–518.
- VERPY, E., LEBOVICI, M., MICHALSKI, N., GOODYEAR, R. J., HOUDON, C., WEIL, D., RICHARDSON, G. P. et PETIT, C. (2011). Stereocilin connects outer hair cell stereocilia to one another and to the tectorial membrane. *The Journal of comparative neurology*, 519(2):194–210.
- VERPY, E., MASMOUDI, S., ZWAENEPOEL, I., LEBOVICI, M., HUTCHIN, T. P., DEL CASTILLO, I., NOUAILLE, S., BLANCHARD, S., LAINÉ, S., POPOT, J. L., MORENO, F., MUELLER, R. F. et PETIT, C. (2001). Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nature genetics*, 29(3):345–9.
- VON BÉKÉSY, G. (1960). *Experiments in hearing*. McGraw-Hill series in psychology. McGraw-Hill.
- VOYAGE AU CENTRE DE L'AUDITION (2016). <http://www.cochlea.eu/cochlee>.
- WADE, R. H. (2009). On and around microtubules: an overview. *Molecular biotechnology*, 43(2):177–91.
- WALLIS, D., HAMBLEN, M., ZHOU, Y., VENKEN, K. J. T., SCHUMACHER, A., GRIMES, H. L., ZOGHBI, H. Y., ORKIN, S. H. et BELLEN, H. J. (2003). The zinc finger transcription factor Gfi1, implicated in lymphomagenesis, is required for inner ear hair cell differentiation and survival. *Development*, 130(1):221–232.
- WALTERS, B. J., COAK, E., DEARMAN, J., BAILEY, G., YAMASHITA, T., KUO, B. et ZUO, J. (2017). In Vivo Interplay between p27Kip1, GATA3, ATOH1, and POU4F3 Converts Non-sensory Cells to Hair Cells in Adult Mice. *Cell Reports*, 19(2):307–320.
- WAN, G., CORFAS, G. et STONE, J. S. (2013). Inner ear supporting cells: rethinking the silent majority. *Seminars in cell & developmental biology*, 24(5):448–59.
- WANG, H., ZANG, C., LIU, X. S. et ASTER, J. C. (2015). The role of notch receptors in transcriptional regulation.
- WANG, J., MARK, S., ZHANG, X., QIAN, D., YOO, S. J., RADDE-GALLWITZ, K., ZHANG, Y., LIN, X., COLLAZO, A., WYNshaw-BORIS, A. et CHEN, P. (2005). Regulation of polarized extension and planar cell polarity in the cochlea by the vertebrate PCP pathway. *Nature Genetics*, 37(9):980–985.
- WEHRLE-HALLER, B. (2012). Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Current opinion in cell biology*, 24(5):569–81.
- WEIBEL, E. R. (1957). [Differentiation processes in the epithelium of ductus cochlearis]. *Acta Anat (Basel)*, 29(1-2):53–90.
- WESTERMANN, S. et WEBER, K. (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(12):938–47.
- WHEATER, P. R., YOUNG, B. et HEATH, J. W. (2001). *Histologie fonctionnelle*. De Boeck Supérieur.
- WHITE, J. S. et WARR, W. B. (1983). The dual origins of the olivocochlear bundle in the albino rat. *The Journal of comparative neurology*, 219:203–214.
- WHITLON, D. S. (1993). E-cadherin in the mature and developing organ of Corti of the mouse. *Journal of Neurocytology*, 22(12):1030–1038.
- WIKSTRÖM, S. O., ANNIKO, M., THORNELL, L. E. et VIRTANEN, I. (1988). Developmental stage-dependent pattern of inner ear expression of intermediate filaments. *Acta Oto-Laryngologica*, 106(1-2):71–80.
- WINDER, S. J. et AYSROUGH, K. R. (2005). Actin-binding proteins. *Journal of cell science*, 118(Pt 4):651–4.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2013). WHO | Deafness and hearing loss <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>.
- WU, D. K. et SANDELL, L. (2016). *Development and Lineage Relationships of the Mouse Inner Ear*, volume 5. Elsevier Inc.
- YAGER, D. D. (1999). Structure, development, and evolution of insect auditory systems. *Microscopy research and technique*, 47(6):380–400.

- YAMAMOTO, N., OKANO, T., MA, X., ADELSTEIN, R. S. et KELLEY, M. W. (2009). Myosin II regulates extension, growth and patterning in the mammalian cochlear duct. *Development*, 136(12):1977–1986.
- ZAGADOU, B., BARBONE, P. et MOUNTAIN, D. (2014a). Elastic properties of organ of Corti tissues from point-stiffness measurement and inverse analysis. *Journal of Biomechanics*, 47(6):1270–1277.
- ZAGADOU, B. F., BARBONE, P. E. et MOUNTAIN, D. C. (2014b). Elastic properties of organ of Corti tissues from point-stiffness measurement and inverse analysis. *Journal of biomechanics*, pages 1–8.
- ZAGADOU, B. F. et MOUNTAIN, D. C. (2012). Analysis of the Cochlear Amplifier Fluid Pump Hypothesis. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 13(2):185–197.
- ZAMPINI, V., RÜTTIGER, L., JOHNSON, S. L., FRANZ, C., FURNESS, D. N., WALDHAUS, J., XIONG, H., HACKNEY, C. M., HOLLEY, M. C., OFFENHAUSER, N., DI FIORE, P. P., KNIPPER, M., MASETTO, S. et MARCOTTI, W. (2011). Eps8 regulates hair bundle length and functional maturation of mammalian auditory hair cells. *PLoS biology*, 9(4): e1001048.
- ZEISBERG, M. et NEILSON, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6):1429–1437.
- ZHANG, W., DAI, M., FRIDBERGER, A., HASSAN, A., DEGAGNE, J., NENG, L., ZHANG, F., HE, W., REN, T., TRUNE, D., AUER, M. et SHI, X. (2012). Perivascular-resident macrophage-like melanocytes in the inner ear are essential for the integrity of the intrastrial fluid-blood barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26):10388–93.
- ZHAO, Y.-d., YAMOA, E. N. et GILLESPIE, P. G. (1996). Regeneration of broken tip links and restoration of mechanical transduction in hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26):15469–74.
- ZHENG, J., SHEN, W., HE, D. Z., LONG, K. B., MADISON, L. D. et DALLOS, P. (2000). Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, 405(6783):149–55.
- ZHONG, C., FU, Y., PAN, W., YU, J. et WANG, J. (2019). Atoh1 and other related key regulators in the development of auditory sensory epithelium in the mammalian inner ear: function and interplay. *Developmental Biology*, 446(2):133–141.
- ZINE, A., HAFIDI, A. et ROMAND, R. (1995). Fimbrin expression in the developing rat cochlea. *Hearing research*, 87(1-2):165–9.
- ZINE, A. et ROMAND, R. (1996). Development of the auditory receptors of the rat: a SEM study. *Brain research*, 721(1-2):49–58.



## V | Annexes

---

*There was a point to this story, but it has temporarily escaped the chronicler's mind.*

— Douglas Adams,  
*So Long, and Thanks for All the Fish*



# Bibliographie personnelle sur le thème de l'oreille interne

- BREUSKIN, I., BODSON, M., THELEN, N., THIRY, M., BORGS, L., NGUYEN, L., LEFEBVRE, P P et MALGRANGE, B. (2009). Sox10 promotes the survival of cochlear progenitors during the establishment of the organ of Corti. *Developmental Biology*, 335(2):327–339.
- BREUSKIN, I., BODSON, M., THELEN, N., THIRY, M., BORGS, L., NGUYEN, L., STOLT, C., WEGNER, M., LEFEBVRE, P P et MALGRANGE, B. (2010). Glial but not neuronal development in the cochleo-vestibular ganglion requires Sox10. *Journal of neurochemistry*, 114(6):1827–39.
- BREUSKIN, I., BODSON, M., THELEN, N., THIRY, M., NGUYEN, L., BELACHEW, S., LEFEBVRE, P P et MALGRANGE, B. (2008). Strategies to regenerate hair cells: identification of progenitors and critical genes. *Hearing research*, 236(1-2):1–10.
- CLOES, M., RENSON, T., JOHNEN, N., THELEN, N. et THIRY, M. (2013). Differentiation of Boettcher's cells during postnatal development of rat cochlea. *Cell and tissue research*, 354(3):707–16.
- DEFOURNY, J., THELEN, N. et THIRY, M. (2019a). Actin-independent trafficking of cochlear connexin 26 to non-lipid raft gap junction plaques. *Hearing Research*, 374:69–75.
- DEFOURNY, J., THELEN, N. et THIRY, M. (2019b). Mechanisms of Development Cochlear connexin 30 homomeric and heteromeric channels exhibit distinct assembly mechanisms. *Mechanisms of Development*, 155(October 2018):8–14.
- DELMAGHANI, S., DEFOURNY, J., AGHAIE, A., BEURG, M., DULON, D., THELEN, N., PERFETTINI, I., ZELLES, T., ALLER, M., MEYER, A., EMPTOZ, A., GIRAUDET, E., LEIBOVICI, M., DARTEVELLE, S., SOUBIGOU, G., THIRY, M., VIZI, E. S., SAFIEDDINE, S., HARDELIN, J.-P., AVAN, P et PETIT, C. (2015). Hypervulnerability to Sound Exposure through Impaired Adaptive Proliferation of Peroxisomes. *Cell*, 163(4):894–906.
- FREEMAN, S., MATEO SÁNCHEZ, S., POUYO, R., VAN LERBERGHE, P, HANON, K., THELEN, N., THIRY, M., MORELLI, G., VAN HEES, L., LAGUESSE, S., CHARIOT, A., NGUYEN, L., DELACROIX, L. et MALGRANGE, B. (2019). Proteostasis is essential during cochlear development for neuron survival and hair cell polarity. *EMBO reports*, 20(9):1–20.
- HUYGHE, A., Van den ACKERVEKEN, P, SACHELI, R., PRÉVOT, P-P, THELEN, N., RENAULD, J., THIRY, M., DELACROIX, L., NGUYEN, L. et MALGRANGE, B. (2015). MicroRNA-124 Regulates Cell Specification in the Cochlea through Modulation of Sfrp4/5. *Cell Reports*, 13(1):31–42.
- JOHNEN, N., FRANCAERT, M.-E., THELEN, N., CLOES, M. et THIRY, M. (2012). Evidence for a partial epithelial-mesenchymal transition in postnatal stages of rat auditory organ morphogenesis. *Histochemistry and cell biology*, 138(3):477–88.
- RENAULD, J., JOHNEN, N., THELEN, N., CLOES, M. et THIRY, M. (2015). Spatio-temporal dynamics of  $\beta$ -tubulin isoforms during the development of the sensory auditory organ in rat. *Histochemistry and Cell Biology*, 144(5):403–416.
- RENAULD, J., THELEN, N., BARTHOLOMÉ, O., MALGRANGE, B. et THIRY, M. (2021). Dispensability of tubulin acetylation for 15-prot filament microtubule formation in the mammalian cochlea. *Cell Structure and Function*, 46(1):11–20.
- THELEN, N., BREUSKIN, I., MALGRANGE, B. et THIRY, M. (2009). Early identification of inner pillar cells during rat cochlear development. *Cell and tissue research*, 337(1):1–14.

# Bibliographie personnelle sur d'autres thèmes

- BARTHOLOMÉ, O., FRANCK, C., PISCICELLI, P., LALUN, N., DEFOURNY, J., RENAULD, J., THELEN, N., LAMAYE, F., PLOTON, D. et THIRY, M. (2019). Relationships between the structural and functional organization of the turtle cell nucleolus. *Journal of Structural Biology*, 208(3):107398.
- BEAUFRÈRE, A., BESSIÈRES, B., BONNIÈRE, M., DRIESSEN, M., ALFANO, C., COUDERC, T., THIRY, M., THELEN, N., LECUIT, M., ATTIÉ-BITACH, T., VEKEMANS, M., VILLE, Y., NGUYEN, L., LERUEZ-VILLE, M. et ENCHA-RAZAVI, F. (2019). A clinical and histopathological study of malformations observed in fetuses infected by the Zika virus. *Brain Pathology*, 29(1).
- BETTONVILLE, V., NICOL, J. T., FURST, T., THELEN, N., PIEL, G., THIRY, M., FILLET, M., JACOBS, N. et SERVAIS, A.-C. (2017). Quantitation and biospecific identification of virus-like particles of human papillomavirus by capillary electrophoresis. *Talanta*.
- BETTONVILLE, V., NICOL, J. T. J., THELEN, N., THIRY, M., FILLET, M., JACOBS, N. et SERVAIS, A.-C. (2015). Study of intact virus-like particles of human papillomavirus by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, pages n/a–n/a.
- CHARLIER, C., LAMAYE, F., THELEN, N. et THIRY, M. (2009). Ultrastructural detection of nucleic acids within heat shock-induced perichromatin granules of HeLa cells by cytochemical and immunocytological methods. *Journal of Structural Biology*, 166(3).
- FREEMAN, S., MATEO SÁNCHEZ, S., POUYO, R., VAN LERBERGHE, P., HANON, K., THELEN, N., THIRY, M., MORELLI, G., VAN HEES, L., LAGUESSE, S., CHARIOT, A., NGUYEN, L., DELACROIX, L. et MALGRANGE, B. (2019). Proteostasis is essential during cochlear development for neuron survival and hair cell polarity. *EMBO reports*, 20(9):1–20.
- GLADWYN-NG, I., CORDÓN-BARRIS, L., ALFANO, C., CREPPE, C., COUDERC, T., MORELLI, G., THELEN, N., AMERICA, M., BESSIÈRES, B., ENCHA-RAZAVI, F., BONNIÈRE, M., SUZUKI, I. K., FLAMAND, M., VANDERHAEGHEN, P., THIRY, M., LECUIT, M. et NGUYEN, L. (2018). Stress-induced unfolded protein response contributes to Zika virus-associated microcephaly. *Nature Neuroscience*, 21(1):63–71.
- HERMAN, J., THELEN, N., SMARGIASSO, N., MAILLEUX, A.-C., LUXEN, A., CLOES, M., DE PAUW, E., CHEVIGNÉ, A., GALLEN, M. et DUMEZ, M.-E. (2014). Der p 1 is the primary activator of Der p 3, Der p 6 and Der p 9 the proteolytic allergens produced by the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(3):1117–24.
- LAGUESSE, S., CREPPE, C., NEDIALKOVA, D., PRÉVOT, P.-P., BORGS, L., HUYSSSEUNE, S., FRANCO, B., DUYSSENS, G., KRUSY, N., LEE, G., THELEN, N., THIRY, M., CLOSE, P., CHARIOT, A., MALGRANGE, B., LEIDEL, S., GODIN, J. et NGUYEN, L. (2015). A Dynamic Unfolded Protein Response Contributes to the Control of Cortical Neurogenesis. *Developmental Cell*, 35(5):553–567.
- LEBRUN, M., LAMBERT, J., RIVA, L., THELEN, N., RAMBOUT, X., BLONDEAU, C., THIRY, M., SNOECK, R., TWIZERE, J.-C., DEQUIEDT, F., ANDREI, G. et SADZOT-DELVAUX, C. (2018). Varicella-zoster virus ORF9p binding to cellular adaptor protein complex 1 is important for viral infectivity. *Journal of Virology*, 92(15).
- LEBRUN, M., THELEN, N., THIRY, M., RIVA, L., OTE, I., CONDÉ, C., VANDEVENNE, P., DI VALENTIN, E., BONTEMS, S. et SADZOT-DELVAUX, C. (2014). Varicella-zoster virus induces the formation of dynamic nuclear capsid aggregates. *Virology*, 454-455:311–327.
- MICHEL, L. N., DAUBY, P., GOBERT, S., GRAEVE, M., NYSSSEN, F., THELEN, N. et LEPOINT, G. (2015). Dominant amphipods of *Posidonia oceanica* seagrass meadows display considerable trophic diversity. *Marine Ecology*, 36(4):969–981.
- THELEN, N., DEFOURNY, J., LAFONTAINE, D. L. J. et THIRY, M. (2021). Visualization of Chromatin in the Yeast Nucleus and Nucleolus Using Hyperosmotic Shock. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3):1132.
- THELEN, N. et THIRY, M. (2017). *DNA labeling at electron microscopy*, volume 1560.
- THIRY, M., CHEUTIN, T., LAMAYE, F., THELEN, N., MEIER, U. T., O'DONOHUE, M.-F. et PLOTON, D. (2009). Localization of Nopp140 within mammalian cells during interphase and mitosis. *Histochemistry and Cell Biology*, 132(2): 129–140.
- THIRY, M., LAMAYE, F., THELEN, N., CHATRON-COLLIET, A., LALUN, N., BOBICHON, H. et PLOTON, D. (2008). A protocol for studying the kinetics of RNA within cultured cells: application to ribosomal RNA. *Nature Protocols*, 3(12):1997–2004.
- THIRY, M. et THELEN, N. (2013). The acetylation method. In EXBRAYAT, J. M., éditeur : *Histochemical and*

## BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE

- Cytochemical Methods of Visualization*, Methods in Visualization, page 269. CRC Press.
- YAZDANI, R., SHAMS-BAKHS, M., HASSANI-MEHRABAN, A., ARAB, S. S., THELEN, N., THIRY, M., CROMMEN, J., FILLET, M., JACOBS, N., BRANS, A. et SERVAIS, A.-C. (2019). Production and characterization of virus-like particles of grapevine fanleaf virus presenting L2 epitope of human papillomavirus minor capsid protein. *BMC Biotechnology*, 19(1):81.





