

## Introduction

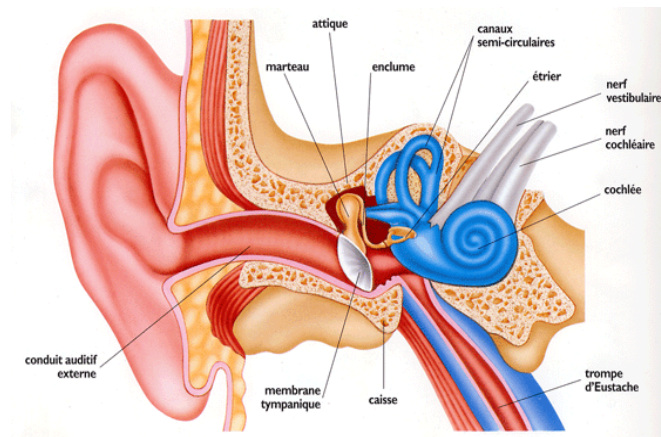
Selon l'Organisation mondiale de la Santé, 278 millions de personnes dans le monde souffrent de déficits auditifs modéré ou profond. On distingue deux grands types de surdité : les surdités de transmission et les surdités de perception. Les premières, liées à la présence d'un obstacle mécanique sur la voie de conduction aérienne du son, conséquences d'une atteinte de l'oreille externe ou de l'oreille moyenne, sont le plus souvent curables médicale ou chirurgicalement. Les infections de l'oreille moyenne chez l'enfant en sont l'exemple le plus courant. Par contre, les surdités de perception, conséquences d'atteintes cochléaires ou rétro-cochléaires sont incurables à l'heure actuelle et ne peuvent bénéficier que d'une r ducation, via une prothèse auditive ou un implant cochléaire. Toute altération de l'intégrité structurelle ou du fonctionnement des divers composants cellulaires de l'oreille interne est donc susceptible de compromettre l'audition. Ainsi, la destruction des cellules ciliées de l'organe de Corti ou des neurones du ganglion spiral, premier relais nerveux, est irréversible et constitue une des causes les plus fréquentes de surdité neurosensorielle. Suite à une agression, un traumatisme sonore, l'administration de médicaments ototoxiques (antibiotiques de la famille des aminoglycosides ou cytostatiques tel que le cisplatine par exemple), ou encore simplement un stress oxydatif lié au vieillissement, les cellules ciliées dégénèrent, entraînant ainsi avec elles la dégénérescence secondaire des neurones auditifs et aboutissant *in fine*   une surdité neurosensorielle irréversible.

Elucider les bases génétiques et moléculaires qui sous-tendent le développement des cellules ciliées et des neurones auditifs primaires, nous paraît essentiel pour permettre la mise au point de stratégies thérapeutiques visant à restaurer la fonction auditive. En cas de lésions ou d'anomalies de l'oreille interne, la *restitutio ad integrum* de l'organe sensoriel de l'audition, l'organe de Corti, est en effet la condition *sine qua none* de la récupération d'une audition fonctionnelle. Aujourd'hui, sachant que les signaux qui contrôlent l'organog nese lors du développement sont souvent impliqués dans les processus de régénération tissulaire, cette idée bien qu'encore éloignée d'une réalité immédiate, quitte le domaine de la science fiction grâce aux nouvelles techniques de manipulations de cellules souches, mais aussi à la découverte de nouveaux gènes qui régulent le développement des cellules de l'oreille interne.

### 1 Anatomie et physiologie du système auditif périphérique

Chez les mammifères, le système auditif périphérique est composé de trois parties distinctes : l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne (Figure 1). Facilitant la localisation sonore et permettant

une modeste amplification des sons, l'oreille externe est constituée du pavillon et du conduit auditif externe. Ces deux structures permettent le cheminement de l'onde sonore amplifiée d'une dizaine de

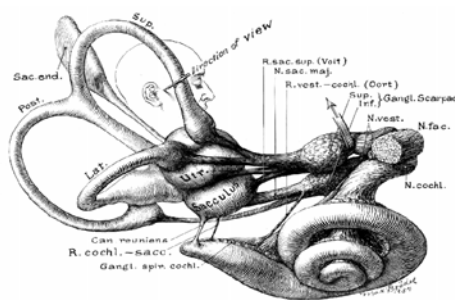


**Figure 1** : Schéma illustrant l'anatomie de l'oreille tiré de <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/1092.htm>

décibels vers le tympan, membrane de jonction entre l'oreille externe et moyenne.

L'oreille moyenne, située dans le rocher, partie pétreuse de l'os temporal, est formée par la membrane tympanique et la chaîne des osselets. Elle assure la transmission des sons du milieu aérien ambiant aux liquides labyrinthiques. Le tympan reçoit les vibrations acoustiques et les transmet à la chaîne ossiculaire par l'intermédiaire du manche du marteau qui lui est solidaire. La chaîne ossiculaire, formée par le marteau, l'enclume et l'étrier, permet la progression de l'onde sonore jusqu'à la platine de l'étrier, au contact de la fenêtre ovale de l'oreille interne. Ce complexe tympano-ossiculaire réalise un véritable système d'amplification du son, permettant la transmission d'une onde sonore aérienne en une onde vibratoire liquidienne sans perte d'énergie.

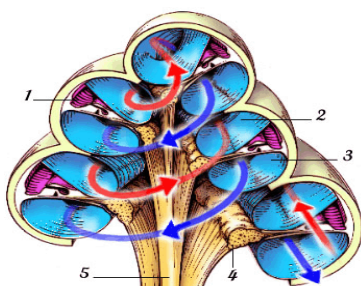
Enfin, l'oreille interne, appelée aussi labyrinthe, est composée de diverses cavités incluses dans l'os du rocher. On distingue d'ailleurs le labyrinthe osseux et le labyrinthe membraneux, composé des structures épithéliales et des fluides de l'oreille interne. Le labyrinthe osseux est le réseau de cavités tubulaires creusées dans le rocher. Il comporte trois parties communicantes remplies de périlymphe : le vestibule, les trois canaux semi-circulaires et la cochlée. Il existe deux ouvertures à ce labyrinthe osseux : la fenêtre ovale, obturée par la platine de l'étrier et la fenêtre ronde, obturée par une membrane appelée le tympan secondaire. Le labyrinthe membraneux baigne dans la périlymphe et est rempli d'endolymphe. Il est formé de plusieurs parties distinctes mais intercommunicantes. On lui distingue une portion postérieure, constituée du vestibule et des canaux semi-circulaires, une portion médiane faite du sac et du canal endolymphatiques et le labyrinthe antérieur, composé du saccule et de la cochlée, organe sensoriel de l'audition (Figure 2).



**Figure 2** : Dessin d'oreille interne montrant que celle-ci est constituée par le vestibule d'une part et par la cochlée de forme spiralée d'autre part, tiré de <http://goodrich.med.harvard.edu/innerear.htm>

### 1.1 Anatomie de l'oreille interne

La cochlée, située à la base du saccule, correspond à la partie auditive de l'oreille interne. Appelée dans le langage courant “limaçon” pour sa structure enroulée, elle est constituée par un axe osseux conique, la columelle, autour duquel s'enroule le tube cochléaire en deux tours trois-quarts de spires chez l'Homme (Figure 3). Cette structure est longitudinalement divisée en deux compartiments par une lame spirale osseuse insérée sur la columelle, qui se prolonge vers l'extérieur par la membrane basilaire qui s'insère sur le ligament spiral. Les deux compartiments, rampes vestibulaire (*scala vestibuli*) en haut

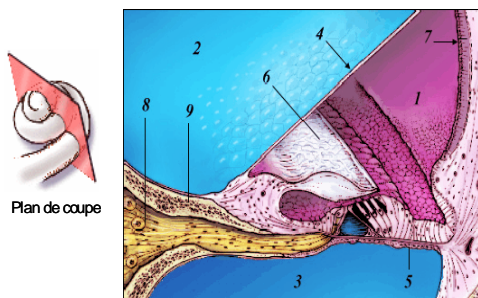


**Figure 3** : Section axiale de la cochlée. Cette section schématise l'enroulement du canal cochléaire (1) contenant l'endolymphe, et celui des rampes vestibulaire et (2) tympanique (3) contenant la périlymphe. La flèche rouge vient de la fenêtre ovale et la bleue aboutit à la fenêtre ronde. Au centre, (modiolus) le ganglion spiral (4) et les fibres du nerf cochléaire (5) apparaissent en jaune. Image issue de “promenade autour de la cochlée”.

et tympanique (*scala tympani*) en bas, déterminent entre eux un troisième compartiment, la rampe médiane ou canal cochléaire (*scala media*). Les rampes vestibulaire et tympanique communiquent au sommet de la cochlée au niveau de l'hélicotreme et sont remplies de périlymphe, fluide dont la composition est proche des liquides extracellulaires. Le canal cochléaire, de section triangulaire, contient l'organe de Corti, organe sensoriel de l'audition, et est rempli d'endolymphe (Figure 4). Riche en potassium ( $[K^+] = 160 \text{ mM}$ ), ce fluide a une composition proche des liquides intracellulaires et est sécrété par les cellules de la strie vasculaire, l'épithélium de la cochlée qui délimite latéralement le canal cochléaire et s'applique contre la partie supérieure du ligament spiral. Le canal cochléaire est isolé de la rampe vestibulaire par la membrane de Reissner, et séparé de la rampe tympanique par la membrane basilaire. L'organe de Corti repose sur cette membrane basilaire et ses cellules sont recouvertes par la membrane tectoriale, membrane glycoprotéique acellulaire.

et tympanique (*scala tympani*) en bas, déterminent entre eux un troisième compartiment, la rampe médiane ou canal cochléaire (*scala media*). Les rampes vestibulaire et tympanique communiquent au sommet de la cochlée au niveau de l'hélicotreme et sont remplies de périlymphe, fluide dont la composition est proche des liquides extracellulaires. Le canal cochléaire, de section triangulaire, contient l'organe de Corti, organe sensoriel de l'audition, et est rempli d'endolymphe (Figure 4). Riche en potassium ( $[K^+] = 160 \text{ mM}$ ), ce fluide a une composition proche des liquides intracellulaires et est sécrété par les cellules de la strie vasculaire, l'épithélium de la cochlée qui délimite latéralement le canal cochléaire et s'applique contre la partie supérieure du ligament spiral. Le canal cochléaire est isolé de la rampe vestibulaire par la membrane de Reissner, et séparé de la rampe tympanique par la membrane basilaire. L'organe de Corti repose sur cette membrane basilaire et ses cellules sont recouvertes par la membrane tectoriale, membrane glycoprotéique acellulaire.

Le système vestibulaire, organe proprioceptif, se compose de trois structures différentes : le saccule, l'utricule et les trois canaux semi-circulaires. L'utricule et le saccule sont respectivement responsables de la perception des accélérations linéaires horizontale et verticale, et les trois canaux semi-circulaires, disposés perpendiculairement entre eux dans les trois plans de l'espace, sont les senseurs des accélérations angulaires.



**Figure 4** : Section transversale au niveau d'un tour de spire de la cochlée. Le canal cochléaire (1), contenant l'endolymphe sécrété par la strie vasculaire (7), est isolé de la rampe vestibulaire (2) par la membrane de Reissner (4). L'organe de Corti est recouvert par la membrane tectoriale (6) flottant dans l'endolymphe; il repose sur la membrane basale (5) au contact de la rampe tympanique (3).

Grâce à l'existence des cellules ciliées sensorielles, la cochlée et le vestibule sont capables de convertir les informations mécaniques environnementales, auditives ou positionnelles, en potentiel d'action. Ces cellules sensorielles sont localisées dans l'organe de Corti pour la cochlée, dans les crêtes ampulaires pour les canaux semi-circulaires et dans les macules pour l'utricule et le saccule. Elles sont connectées aux projections dendritiques des neurones auditifs et vestibulaires. Les axones de ces cellules nerveuses forment respectivement les nerfs cochléaire et vestibulaire, dont la réunion forme le nerf acoustique (VIII<sup>ème</sup> paire de nerfs crâniens). Les projections centrales du nerf acoustique se font sur les noyaux cochléo-vestibulaires du tronc cérébral, réalisant à cet endroit le deuxième relais des voies auditives centrales.

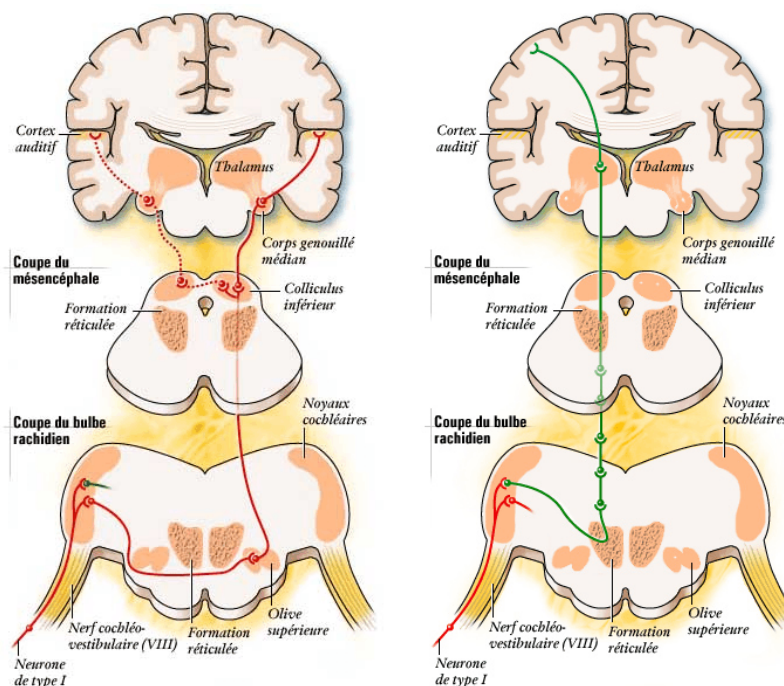
### 1.2 Transduction du son

Les déplacements vibratoires de la platine de l'étrier dans la fenêtre ovale génèrent au niveau de la périlymphe une onde de pression qui, suite à la déformation de la fenêtre ronde, est capable de se propager dans les fluides de l'oreille interne. Les déplacements liquidiens induits par cette onde de pression entraînent des déplacements vibratoires du canal cochléaire, responsables de mouvements de la membrane basilaire liés à ses caractéristiques physiques, et définis par un phénomène de résonance qui existe entre cette dernière et la fréquence du son incident (Von Békésy, 1960). La représentation topographique des fréquences sur la membrane basilaire, appelée tonotopie, explique que la membrane basilaire présente un maximum de résonance, se déplaçant de la base vers l'apex de la cochlée au fur

et à mesure que la fréquence du son diminue. En d'autres termes, les sons aigus provoquent des vibrations maximales à la base de la cochlée tandis que la détection des sons graves se fait à son apex, là où la membrane basilaire est plus large.

A chaque mouvement de la membrane basilaire correspond un déplacement des fluides de l'oreille interne qui entraînent le cisaillement des stéréocils des cellules ciliées externes. Le mouvement des stéréocils provoque une stimulation de ces cellules et leurs contractions itératives (Brownell et al., 1985). La contraction des cellules réalise alors un couplage entre la membrane basilaire et la membrane tectoriale, responsable d'une amplification de la vibration dans une région très restreinte du canal cochléaire. Ceci permet alors la mobilisation des stéréocils des cellules ciliées internes, qui se comportent comme les véritables cellules sensorielles, possédant un maximum de sensibilité et de sélectivité pour une fréquence donnée. Les cellules ciliées internes ainsi stimulées libèrent de glutamate dans la fente synaptique qui permet la genèse d'un potentiel d'action dans les neurones du ganglion spiral qui leurs sont connectés. L'influx nerveux va ensuite être transmis par le premier neurone situé dans le ganglion spiral aux noyaux bulbo-protubérantiels cochléaires. C'est seulement à partir de ces derniers que l'on parlera de voies auditives centrales.

Une chaîne de cinq neurones au minimum forme la voie auditive centrale. Les noyaux cochléaires, le colliculus inférieur (tubercule quadrijumeau inférieur) et le corps genouillé médian constituent les relais "obligatoires" de ces voies auditives. Les noyaux du complexe olivaire supérieur et les noyaux



**Figure 5** : Schéma de la voie auditive primaire, tiré de "promenade autour de la cochlée".

**Figure 6** : Schéma de la voie auditive accessoire, tiré de "promenade autour de la cochlée".

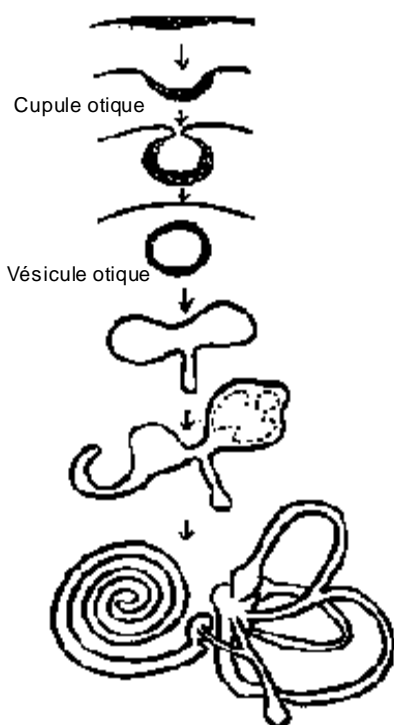
du lemniscus latéral sont quant à eux des relais facultatifs (Figure 5 et 6). La cible terminale de ces voies auditives, est le cortex auditif primaire, situé dans la première circonvolution temporale, connue sous le nom de circonvolution de Heschl.

L'exploration de ces voies auditives centrales peut se faire par l'enregistrement des potentiels évoqués auditifs, ensemble des réponses des différents relais de la voie auditive centrale suite à la répétition d'une brève stimulation acoustique ("clic"). Les potentiels auditifs utilisés chez l'Homme et l'animal sont les potentiels évoqués auditifs précoces, en provenance des noyaux du tronc cérébral, mieux connu sous le nom d'ABR (*Auditory Brainstem Response*).

## 2 Développement de l'oreille interne

### 2.1 Embryogenèse de l'oreille interne

La phylogenèse nous apprend comment s'est déroulé, durant l'évolution des espèces, le développement de l'oreille interne. Initialement organe stato-acoustique chez les vertébrés inférieurs existant pour



**Figure 7** : Représentation schématique du développement embryonnaire de l'oreille interne.

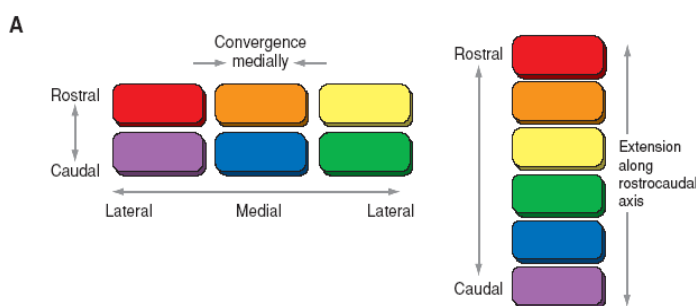
assurer l'équilibre, l'oreille interne s'est profondément développée au fil de l'évolution pour permettre la perception des sons. La partie ventrale de l'organe stato-acoustique, lagena et papille basilaire respectivement chez les amphibiens et les oiseaux, cochlée chez les mammifères, possède une organisation d'autant plus complexe que l'organisme est évolué. Le développement du système auditif des vertébrés débute par la formation de la placode otique. Sous l'influence de signaux inducteurs provenant du rhombencéphale au niveau de rhombomères 5 et 6 (Stone LS, 1931), de l'ectoderme et du mésoderme cranial (Fritzscher, 1996), une zone d'épaississement de l'ectoderme céphalique s'individualise pour former la placode otique, future oreille interne (huitième jour et demi de vie embryonnaire, E8.5, chez la souris) (Larsen et al., 2001; Rubel EW, 1978; Sher, 1971). Progressivement, chaque placode va s'invaginer, former la cupule otique, puis s'isoler de la surface et former la vésicule otique, encore appelée otocyste (E9.5 chez la souris) (Represa et al., 1990). C'est par un mode de

croissance asymétrique que cette vésicule otique va évoluer et donner naissance à trois portions

distinctes : une partie vestibulaire dorsale, une partie sacculaire ventrale et une partie endolymphatique médiane (Bissonnette and Fekete, 1996; Fekete and Wu, 2002; Morsli et al., 1998; Torres and Giraldez, 1998) (Figure 7).

Le système vestibulaire, organe sensoriel responsable de l'équilibre, émane du développement de la partie dorsale de l'otocyste. Il se différencie en trois canaux semi-circulaires, qui se réunissent en une portion commune, l'utricule. L'appendice endolymphatique forme le canal et le sac endolymphatiques, responsables de la résorption de l'endolymphe. La paroi ventrale du saccule donne naissance au canal cochléaire qui croit en s'enroulant en spirale, de 2 à 4 tours de spires selon l'espèce, pour former la cochlée. C'est l'épithélium de ce canal qui va composer le futur organe de Corti, organe sensoriel de l'audition (Swanson et al., 1990).

Pour atteindre son stade mature, spiralé à partir d'une structure linéaire, la cochlée se développe par un mécanisme embryonnaire connu sous le nom d'extension convergente (Jones and Chen, 2007; Wang et al., 2005). Ce mode de développement, utilisé notamment durant la gastrulation et la neurulation, permet à une structure embryonnaire une élongation ainsi qu'un amincissement, indépendamment de toute prolifération ou mort cellulaire (revu dans Keller, 2002). Les cellules se réorganisent en s'intercalant par une série de mouvements latéraux, et convergent vers la ligne médiane de la structure



**Figure 8** : Représentation schématique du réarrangement cellulaire par extension convergente tirée de (Montcouquiol et al., 2006a)

embryonnaire en croissance (Figure 8). Ces mouvements cellulaires permettent ainsi une élongation de la structure sous-jacente, en l'occurrence ici le canal cochléaire (Montcouquiol et al., 2006a).

Des études portant sur la réorganisation spatiale des cellules du domaine prosensoriel (McKenzie et al., 2004) ou plus spécifiquement des cellules ciliées (Chen et al., 2002) montrent qu'au cours du développement embryonnaire tardif surviennent progressivement une élongation et un amincissement de la structure générale du canal cochléaire. Réalisées lors de la phase de différenciation terminale des cellules de l'épithélium du canal cochléaire (E14.5 - E18.5), après la phase de prolifération cellulaire, ces études suggèrent qu'à la fois des mécanismes d'extension et de convergence entrent en jeu lors du développement cochléaire. En effet, au cours du développement embryonnaire, l'épithélium, composé d'une épaisseur de 4 à 5 cellules, s'amincit pour former l'épithélium bistratifié de l'organe de Corti, sans qu'on ne puisse constater de phénomènes apoptotiques au sein de cet épithélium (Chen et al., 2002; McKenzie et al., 2004).



Dès la fermeture de la cupule otique, les neuroblastes émigrent de sa région antéro-ventrale et se différencient en cellules ganglionnaires, pour former le ganglion stato-acoustique, ou ganglion cochléo-vestibulaire (GCV) (D'Amico-Martel and Noden, 1983; Torres and Giraldez, 1998; Van Laer L. et al., 2001). Ultérieurement, celui-ci sera scindé en deux structures distinctes : le ganglion vestibulaire ou ganglion de Scarpa et le ganglion cochléaire ou ganglion spiral. Tous les composants cellulaires de l'oreille interne proviennent de la placode otique et possèdent donc une origine ectodermique, excepté deux types cellulaires. Les mélanoblastes, futurs mélanocytes de la strie vasculaire et des régions des cellules sombres vestibulaires, épithéliums sécrétants du labyrinthe membraneux d'une part, et les cellules gliales des ganglions cochléaire et vestibulaire d'autre part, proviennent en effet des cellules dérivant des crêtes neurales.

### 2.1.1 Gènes impliqués dans la formation et le développement de la placode otique

L'action coordonnée de facteurs extrinsèques et intrinsèques, dans et autour de l'oreille interne en développement, est essentielle à l'embryogenèse et à la morphogenèse otiques. Ainsi, la mutation ciblée de nombreux gènes nous renseigne sur leur rôle durant le développement de l'oreille interne (revu par Anagnostopoulos, 2002; Bok et al., 2007a).

#### 2.1.1.1 Signaux d'induction

L'induction de la placode otique résulte de la combinaison de différents signaux d'origine à la fois mésodermique et neurogénique (Baker and Bronner-Fraser, 2001; Ladher et al., 2000). Sous l'influence de signaux mésodermiques, l'ectoderme est rendu compétent pour former la placode otique (Groves and Bronner, 2000). Celle-ci va se développer en vésicule otique sous l'influence des rhombomères 5 et 6 - le neurectoderme adjacent - et subir ultérieurement des modifications morphogénétiques permettant l'élaboration de la structure tridimensionnelle complexe de l'oreille interne mature (revu dans Ohyama et al., 2007).

- Les rétinoïdes

Les rétinoïdes, analogues structuraux de la vitamine A, biologiquement actifs, possèdent un rôle fondamental dans le développement de l'oreille (Choo et al., 1998). Les effets des rétinoïdes sont traduits par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires, les RARs ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) et les RXRs ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). Les souris ayant des dysfonctionnements dans la synthèse des rétinoïdes ou de leurs récepteurs présentent des défauts de segmentation du rhombencéphale ainsi que des anomalies du développement de l'oreille interne. Par exemple, les souris invalidées pour la Retinaldehyde dehydrogenase2 (*Raldh2*), qui sont incapables de synthétiser de l'acide rétinoïque, ont un développement anormal du rhombencéphale (Niederreither et al., 2000). Leurs otocystes sont hypoplasiques et localisés anormalement loin du rhombencéphale (Niederreither et al., 2000). L'inactivation des gènes codant pour certains récepteurs aux rétinoïdes, les RXRs, conduit également à la formation d'otocystes hypoplasiques (Lohnes et al., 1994; Wendling et al., 1999). Par ailleurs, les souris doubles mutantes invalidées pour les RAR $\alpha$  et  $\beta$



présentent un rhombomère 5 élargi, permettant ainsi l'apparition de vésicules otiques surnuméraires (Dupe et al., 1999).

- Gènes Homeobox

Au stade de la formation de la placode otique, *Hoxa1*, un facteur de transcription à homéodomaine, est exprimé transitoirement dans la région des rhombomères 4-6, et disparaît lorsque l'otocyste est complètement formé (Pasqualetti et al., 2001). L'inactivation de *Hoxa1* chez la souris conduit à des anomalies du développement du rhombencéphale avec en particulier une absence du rhombomère 5 (Carpenter et al., 1993; Chisaka et al., 1992; Lufkin et al., 1991), secondairement responsable d'anomalies du développement de l'otocyste (Carpenter et al., 1993; Gavalas et al., 1998; Mark et al., 1993b; Mark et al., 1993a). Chez ces souris invalidées pour *Hoxa1*, l'administration lors de la gestation d'acide rétinoïque, permet de restaurer le développement normal de la vésicule otique chez les embryons (Pasqualetti et al., 2001). L'inactivation conjointe des gènes *Hoxa1* et *Hoxb1* conduit à des altérations plus importantes du développement des rhombomères 3-6, augmentant ainsi la pénétrance du phénotype otique (Gavalas et al., 1998; Rossel and Capecchi, 1999). Chez ces souris invalidées pour *Hoxa1* et *Hoxb1*, on observe à la fois une absence de développement cochléaire et une aplasie vestibulaire (Gavalas et al., 1998; Rossel and Capecchi, 1999), suggérant que *Hoxa1* et *Hoxb1* possèdent des rôles synergiques.

- Les FGFs

Les membres de la famille des *fibroblast growth factors* (FGFs), protéines diffusibles, sont impliqués dans la formation de l'oreille interne (Baker and Bronner-Fraser, 2001; Noramly and Grainger, 2002; Rinkwitz et al., 2001) (revu dans Schimmang, 2007). Parmi ceux-ci, le FGF3 apparaît comme un des inducteurs otiques principaux. Son expression dans le rhombencéphale en développement, à proximité de la placode otique (Wilkinson et al., 1988) est en effet conservée entre les espèces chez les vertébrés (Baker and Bronner-Fraser, 2001; Groves and Bronner, 2000; Lombardo and Slack, 1998; Mahmood et al., 1995). La délétion de l'exon 1b (*Fgf3<sup>tm1mrc</sup>*) ou de l'exon 2 (*Fgf3<sup>A2</sup>*) codant pour le FGF3 aboutit à des anomalies de formation et de morphogenèse de la vésicule otique. Celles-ci s'étendent d'une anatomie normale à une absence de canal et de sac endolymphatique, une absence de développement des structures vestibulaires, associées éventuellement à une diminution de l'enroulement cochléaire (Hatch et al., 2007; Mansour et al., 1993). Parallèlement, l'inactivation des exons 1b, 2 et 3 (*Fgf3<sup>tm1Sng</sup>*) n'a pas permis de reproduire ces mêmes résultats (Alvarez et al., 2003).

L'inactivation de la portion codante pour le FGF10, exprimé par le mésoderme sous-jacent à la placode otique, a également pour conséquence une diminution de la taille de la vésicule otique et est responsable d'une dysgénésie des canaux semi-circulaires (Ohuchi et al., 2000; Ohuchi et al., 2005; Pauley et al., 2003). Qui plus est, l'expression de FGF10 par les cellules du mésoderme pourrait également être un signal d'induction de formation de l'oreille interne (Wright and Mansour, 2003). L'inactivation

concomitante du FGF3 et du FGF10 est responsable d'une diminution de l'expression des marqueurs précoces de la placode otique tels que *Pax2* et *Dlx5*. Ces souris *Fgf3<sup>-/-</sup>;Fgf10<sup>-/-</sup>* présentent une vésicule otique de taille réduite et une absence de ganglion cochléo-vestibulaire (Alvarez et al., 2003;Zelarayan et al., 2007). Par ailleurs, il est intéressant de constater que la surexpression de *Fgf10* est suffisante pour induire la formation de vésicules otiques ectopiques exprimant des marqueurs otiques (Alvarez et al., 2003).

Le FGF3 et le FGF10 sont donc des régulateurs paracrines du développement de l'oreille interne et leur effet est médié par un récepteur exprimé dans l'épithélium otique, l'isoforme IIIb du récepteur 2 aux FGFs de haute affinité (*Fgfr2(IIIb)*) (Orr-Urtreger et al., 1993;Pirvola et al., 2000). Les souris invalidées pour ce récepteur développent une placode otique et un otocyste normaux (De Moerlooze L. et al., 2000), suggérant que le *Fgfr2(IIIb)* n'est pas essentiel pour les stades précoces de la formation de l'oreille interne. Cependant, des dysgénésies sévères cochléo-vestibulaires apparaissent ultérieurement, à savoir, des défauts de la morphogenèse et de la différenciation de l'otocyste (Pirvola et al., 2004).

Le FGF8 semble également avoir un rôle important dans l'induction de la placode otique. Il est exprimé précocement au cours du développement dans l'endoderme et le mésoderme adjacent à la future placode otique et dans l'ectoderme préplacodal lui-même. Son invalidation ne modifie pas la formation de la vésicule otique (Ladher et al., 2005;Zelarayan et al., 2007). Par contre, l'analyse de souris doublement invalidées pour les FGF3 et FGF8 montre que celles-ci présentent un phénotype similaire aux doubles mutants *Fgf3<sup>-/-</sup>;Fgf10<sup>-/-</sup>* avec une diminution de la taille de la vésicule otique voire parfois même, l'absence complète d'otocyste (Ladher et al., 2005;Zelarayan et al., 2007). Ainsi, il existe un rôle redondant des FGF3, 8 et 10 dans l'induction de la placode otique chez les mammifères.

- Les facteurs Wnt

La famille des facteurs de croissance *Wnt* (Wingless int) est importante pour le déterminisme, la prolifération et la survie cellulaire lors du développement embryonnaire (revu dans Wodarz and Nusse, 1998). A ce jour, 19 gènes *Wnt* ont été identifiés chez les vertébrés, et deux grandes voies de signalisation leurs sont décrites, la voie canonique et la voie non canonique (revu par Logan and Nusse, 2004;Strutt, 2003). La voie canonique, première voie de signalisation des *Wnt* initialement identifiée, conduit à la stabilisation de la  $\beta$ -caténine par l'inhibition de la Glycogène Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) (Itoh et al., 1998;Kishida et al., 1999;Smalley and Dale, 1999). Une fois en quantité suffisante dans le cytoplasme, la  $\beta$ -caténine est transloquée dans le noyau où elle est capable d'activer la transcription de certains gènes. Pour activer la voie canonique, les Wnt doivent se lier à des récepteurs à sept domaines transmembranaires, membres de la famille des récepteurs Frizzled (Fz) (revu par Huang and Klein, 2004). La liaison des Wnt aux Fz entraîne la phosphorylation de Dishevelled (Dvl), protéine cytosolique, qui en retour inhibe GSK-3 $\beta$ . Lors de l'activation de la voie non canonique, les Wnt se lient aussi aux récepteurs Fz, et Dvl est également activée, mais au lieu d'entraîner une stabilisation de

la  $\beta$ -caténine, cette voie non canonique active la voie “Calcium/PKC”, responsable d’un accroissement du taux de calcium intracellulaire et de l’activation de la protéine kinase C (PKC) (Kuhl et al., 2000;Sheldahl et al., 1999). Récemment, chez la souris, il a été montré que les facteurs Wnt en provenance du rhombencéphale sont nécessaires pour limiter la région ectodermique destinée à former la placode otique (Ohyama et al., 2006). En effet, la voie Wnt contrôlerait, par l’intermédiaire de la voie canonique, le destin de la région ectodermique en agissant sur les précurseurs *Pax2* positifs pour les instruire d’un destin placodal plutôt qu’ectodermique (Ohyama et al., 2006). A l’heure actuelle, on ne sait pas quel facteur *Wnt* joue exactement un rôle dans l’induction de la placode otique chez les mammifères. Chez la souris, il a été montré que *Wnt8* est exprimé dans le rhombomère 4 (Bouillet et al., 1996;Hume and Dodd, 1993) et que *Wnt1* et *3a* sont présents dans la partie dorsale du rhombencéphale (Parr et al., 1993;Riccomagno et al., 2005). Ils constitueraient ainsi de bons candidats en tant qu’inducteurs de la placode otique. Par ailleurs, les *Wnt* jouent également un rôle dans la détermination du destin vestibulaire. Chez les souris *Wnt1<sup>-/-</sup>;Wnt3a<sup>-/-</sup>*, l’absence d’expression de *Dlx5* et *6* est observée dans la portion dorsale de l’otocyste. Ultérieurement lors du développement, ces souris seront dépourvues de structures vestibulaires (Riccomagno et al., 2005).

#### 2.1.1.2 Régionalisation tissulaire

Lors du développement embryonnaire, la spécification du destin de la vésicule otique est régie par l’expression compartimentée de gènes spécifiques au sein de l’épithélium otique. Les gènes exprimés dans la partie ventrale de la vésicule otique sont impliqués dans le destin cochléaire de l’otocyste, tandis que les gènes exprimés dans la partie dorsale de la vésicule réguleront le devenir vestibulaire des cellules otiques. Nous décrivons ici de façon non-exhaustive, les gènes impliqués dans ces choix de destin morphogénétique.

- Détermination du destin cochléaire
  - *Pax2*

Le gène paired box 2, codant pour le facteur de transcription *Pax2*, est exprimé spécifiquement dans la portion ventrale de l’otocyste, destinée à former la cochlée et le saccule (Lawoko-Kerali et al., 2002). L’invalidation de ce gène chez la souris, marqueur parmi les plus précoces de la placode otique (Groves and Bronner, 2000;Pfeffer et al., 1998), se traduit par une agénésie de la cochlée et du ganglion spiral (Burton et al., 2004;Favor et al., 1996;Torres et al., 1996).

- *Eya1*

Homologue du gène *Eyes absent* de la *Drosophile*, *Eya1* est exprimé dans toute la placode otique puis se restreint à la paroi ventro-médiale de l’otocyste et au ganglion cochléo-vestibulaire (Kalatzis et al., 1998). La mutation de ce gène chez la souris est dévastatrice pour l’oreille. De façon précoce, dès E8.5, les souris *Eya1<sup>-/-</sup>* montrent une diminution de la prolifération cellulaire et un accroissement de l’apoptose dans la placode otique (Zou et al., 2006). La formation de l’oreille interne est rudimentaire,

les différents composants de l'oreille ne se développent pas et les cellules du ganglion cochléo-vestibulaire ne sont pas formées (Xu et al., 1999). En outre, ces souris présentent également des malformations de l'oreille moyenne et de l'oreille externe (Abdelhak et al., 1997; Johnson et al., 1999).

– *GATA3*

*GATA3*, un facteur de transcription de la famille des protéines à doigt de Zinc, est exprimé de façon précoce dans l'otocyste et dans le mésenchyme périotique (Nardelli et al., 1999; Oosterwegel et al., 1992). Au fil du développement, son expression persiste dans les structures épithéliales et nerveuses du système auditif (Lawoko-Kerali et al., 2002; Lillevali et al., 2004; Rivolta and Holley, 1998). L'inactivation de *GATA3* chez la souris conduit à une dysgénésie sévère de l'oreille interne avec un arrêt du développement morphogénétique de la vésicule otique. La placode s'invagine difficilement pour former la vésicule otique (Lillevali et al., 2006) et cette dernière est kystique avec peu de vellités d'extension du canal endolymphatique. Selon les études, on ne lui distingue pas de cochlée, d'utricule, de saccule et de canaux semi-circulaires (Karis et al., 2001; Lillevali et al., 2006; Rivolta and Holley, 1998). Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que l'expression de FGF10 dans l'épithélium otique des souris *GATA3*<sup>-/-</sup> est diminuée suggérant que GATA3 pourrait être un des facteurs de contrôle de l'expression du FGF10 dans l'oreille interne (Lillevali et al., 2006).

– *Shh*

*Sonic Hedgehog*, homologue de hedgehog chez la Drosophile est un des premiers régulateurs de l'orientation du destin de l'otocyste vers un phénotype cochléaire (Riccomagno et al., 2002). Chez les souris dont le gène codant pour *Shh* a été invalidé, l'induction de la placode otique se fait normalement. Par contre, elles présentent une absence de croissance des dérivés de la portion ventrale de la vésicule otique, c'est-à-dire le canal cochléaire, le saccule et le ganglion cochléo-vestibulaire (Bok et al., 2007b; Liu et al., 2002; Riccomagno et al., 2002).

– *Otx1* et *Otx2*

Orthologues murins des gènes orthodenticles de la Drosophile, *Otx1* et *Otx2*, exprimés dans la partie ventro-latérale de l'otocyste de façon partiellement recouvrante, sont des facteurs de transcription importants pour le développement de la tête et des organes des sens (Acampora et al., 1995; Acampora et al., 1996; Hirth et al., 1995; Royet and Finkelstein, 1995). Les souris invalidées pour *Otx1* montrent une absence de canal semi-circulaire latéral, une cochlée malformée ainsi qu'une mauvaise individualisation de l'utricule et du saccule (Acampora et al., 1996; Acampora et al., 1997; Acampora et al., 1998; Morsli et al., 1999). Les mutants *Otx2* étant létaux, les souris doubles mutantes partielles ont été étudiées, les souris *Otx1*<sup>-/-</sup>*Otx2*<sup>+/-</sup>, et montrent une altération du développement otique plus importante que l'inactivation isolée de *Otx1*, particulièrement au niveau du saccule et de la cochlée dont la forme et la longueur sont fortement atteintes (Morsli et al., 1999). Ces gènes semblent donc avoir une fonction à la fois redondante et spécifique, *Otx1* semble critique pour la formation du canal latéral et

des crêtes ampulaires, tandis que *Otx2* paraît essentiel au déterminisme des structures ventrales que sont la cochlée et le saccule.

- Détermination du destin vestibulaire
  - *Hmx2* et *Hmx3*

*Hmx2* et *Hmx3*, également appelés *Nkx5.2* et *Nkx5.1*, font partie de la famille des facteurs de transcription à homéodomaine. *Hmx3* est exprimé dans la partie rostrale de la placode dès E8.5 et son expression gagne progressivement la région médiale puis dorso-latérale de l'otocyste (Hadrys et al., 1998). La mutation de ce gène chez la souris se traduit par une dysgénésie vestibulaire, l'absence du développement du canal semi-circulaire latéral et des anomalies du développement des canaux antérieur et postérieur. La cochlée, le système endolymphatique, l'utricule et le saccule se développent tout à fait normalement. *Hmx2* est lui exprimé dans la partie antérieure de l'otocyste à partir de E9.5, puis son expression se restreint à la région antéro-dorsale, pour être finalement exprimé majoritairement dans le canal endolymphatique (Wang et al., 2001a). L'inactivation d'*Hmx2* chez la souris induit un déficit dans la formation des canaux semi-circulaires et dans le développement du vestibule (Wang et al., 2001a). Par ailleurs, les animaux invalidés simultanément pour ces deux gènes présentent une dégénérescence vestibulaire complète alors que l'intégrité de la cochlée est parfaitement conservée (Wang et al., 2004).

- *Dlx5*

Homologue du gène *Distal-less* de la Drosophile, *Dlx5* est un facteur exprimé dans la région dorso-postérieure de l'otocyste destinée à former les canaux semi-circulaires. Son invalidation conduit à une agénésie des canaux antérieur et postérieur ainsi qu'à une dysgénésie du canal latéral (Acampora et al., 1999; Depew et al., 1999; Merlo et al., 2002). Selon les études, des anomalies de l'enroulement de la cochlée et de formation du canal endolymphatique peuvent également être observées (Merlo et al., 2002; Robledo and Lufkin, 2006). Par ailleurs, les souris *Dlx5<sup>-/-</sup>; Dlx6<sup>-/-</sup>* présentent également une initiation correcte de l'induction placodale, mais les dérivés de la portion médio-dorsale de l'otocyste, les canaux semi-circulaires, l'utricule, le saccule et le sac endolymphatique ne se forment pas (Robledo and Lufkin, 2006).

### 2.1.2 Neurogenèse otique

A l'exception de la placode optique, les placodes embryonnaires sont douées d'un potentiel neurogénique, signifiant qu'elles possèdent la capacité de générer des neurones sensoriels (Begbie et al., 2002; Ma et al., 2000). La détermination des progéniteurs neuraux est une des étapes les plus précoces dans le déterminisme cellulaire de l'oreille interne en développement. En effet, les neuroblastes sont les premières cellules à se différencier lors de l'invagination de la placode otique (Fekete and Wu, 2002; Hossain and Morest, 2000). Ces cellules s'individualisent au sein de l'épithélium

ventral de la vésicule otique, perdent leurs connexions intercellulaires et migrent dans le mésenchyme où elles se regroupent pour former le ganglion cochléo-vestibulaire (D'Amico-Martel, 1982). Ces neuroblastes vont ensuite se diviser, amplifier la population neuronale du ganglion (Alsina et al., 2003; Camarero et al., 2003) puis se différencier en neurones et initier leur neurogenèse pour permettre l'innervation des différentes structures épithéliales sensorielles de l'oreille interne (Alsina et al., 2003; Camarero et al., 2003; Fritsch et al., 2002).

#### 2.1.2.1 Activation des gènes proneuraux

Le contrôle de la formation des neuroblastes est effectué par les protéines “proneurales” (Simpson and Carteret, 1990). Ces facteurs de transcription de la famille des bHLH initient le programme de neurogenèse dans les progéniteurs neuraux (Guillemot, 2007). Leur expression aboutit à un déterminisme neuronal, une sortie du cycle cellulaire, promeut la différenciation ainsi que l'activation de la voie de signalisation Notch (voir paragraphe suivant). Les principales protéines proneurales chez la souris sont *Mash1* (*Asch1*), Neurogénine (*Ngn*) 1-3, *Atoh1* (*Math1*) et *NeuroD*. Elles sont toutes des analogues des gènes proneuraux de la Drosophile *atonal* (*ato*) et *achaete-scute* (*asc*), nécessaires au développement des organes mécanosensoriels ou chordotonaux composés d'une unité sensorielle et de neurones.

Chez la souris, les cellules du domaine neuro-sensoriel expriment des niveaux plus élevés de *Ngn1* dans la cupule otique (Ma et al., 2000). Peu après l'initiation de l'expression de *Ngn1*, l'expression d'autres gènes proneuraux de type bHLH tels que *NeuroD* est observée dans les neuroblastes épithéliaux et dans les neuroblastes en migration. L'analyse fonctionnelle de *Ngn1* et de *NeuroD* suggère qu'ils sont à la fois nécessaires et suffisants pour induire la neurogenèse otique. L'inactivation de la *Ngn1* chez la souris se traduit par une perte des neurones otiques vestibulaires et auditifs et une diminution du nombre de cellules ciliées (Ma et al., 2000). L'invalidation de *NeuroD* quant à elle, compromet la délamination des neuroblastes, et conduit à une perte sévère des neurones sensoriels otiques (Chae et al., 2004; Kim et al., 2001; Liu et al., 2000). La séquence d'activation de *Ngn1* puis de *NeuroD* ainsi que les phénotypes observés chez les souris invalidées pour ces gènes suggèrent que la *Ngn1* aurait conservé la fonction de déterminisme neural du gène *atonal* de la Drosophile tandis que *NeuroD* se serait spécialisé dans la différenciation et la survie neuronale (Kim et al., 2001; Ma et al., 2000).

#### ● La voie Notch

La voie Notch régule de nombreux processus biologiques, tels que des décisions de destin cellulaire, de prolifération, d'apoptose, de différenciation cellulaire ou encore de division cellulaire asymétrique (revu dans Artavanis-Tsakonas et al., 1999). La fonction de la voie Notch est assurée par ses récepteurs, Notch1-4, des ligands (Delta1 et 2, Jagged1 et 2) et des modulateurs (Lnfg, Hes1, Hes5 par exemple) dont la plupart sont exprimés dans la placode otique (Adam et al., 1998; Cole et al., 2000; Eddison et al.,

2000). Le rôle le plus évident de cette voie réside dans sa capacité d'influencer des cellules voisines en promouvant un état cellulaire dans une cellule donnée et en favorisant l'adoption d'un état cellulaire opposé dans la cellule adjacente. Ce mécanisme développemental porte le nom d'inhibition latérale. L'activation de Notch génère une boucle de rétrocontrôle négatif qui lui permet de réprimer son ligand. D'une façon générale, les cellules activées pour Notch restent à un état de progéniteurs indifférenciés et répriment l'activité des gènes proneuraux tandis que les cellules Delta1 positives entrent en différenciation neuronale (revu dans Lewis et al., 1998). Delta1 est exprimé par les futurs neuroblastes dans la région neurogénique de la vésicule otique, juste avant leur migration (Whitfield et al., 1997). Notch, Jag1 et Hes1 sont exprimés dans les régions non-neurales tandis que Lfng, Delta1 et Hes5 sont inhibés dans ces mêmes régions. L'expression complémentaire et précoce de Jag1/Hes1 et Dll1/Lfng/Hes5 pourrait refléter le rôle de Notch dans la distinction d'un domaine "neural" *versus* "non-neural". Lors de la stabilisation du domaine proneural, l'activité de Notch, via la liaison de Jag1 dans le domaine "non-neural" pourrait activer Hes1 et inhiber leur activité proneurale. L'inhibition de la voie Notch conduit à la production d'un excès de précurseurs neuronaux dans l'oreille interne (Abello and Alsina, 2007; Abello et al., 2007; Haddon et al., 1998). Ainsi, la voie de signalisation Notch est nécessaire à la neurogenèse otique pour réguler le nombre de cellules à destin neuronal qui entrent en différenciation neuronale. Elle n'est donc pas responsable de l'établissement du domaine proneural, mais s'avère essentielle au maintien d'un pool de progéniteurs cellulaires possédant des caractéristiques proneurales.

- Rôle des facteurs trophiques

- Les FGFs

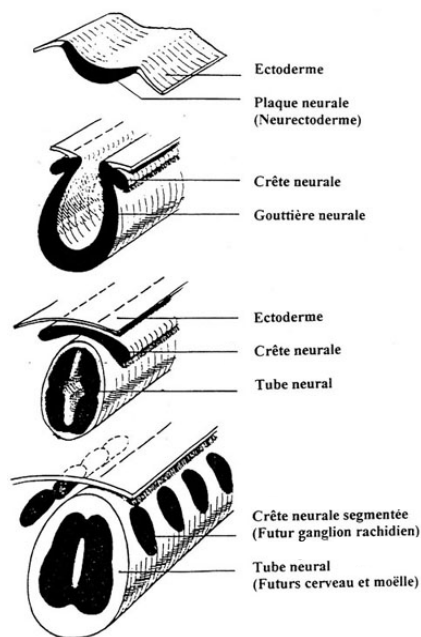
Outre leur rôle dans l'embryogenèse précoce de la placode otique (voir paragraphe précédent), les *fibroblast growth factors* (FGFs) sont également impliqués dans la neurogenèse otique. Chez la souris, le FGF2 (ou bFGF) est exprimé dans la placode et la vésicule otique (Vendrell et al., 2000) et favorise la migration et la différenciation des neurones du ganglion cochléo-vestibulaire (Adamska et al., 2001; Hossain et al., 1996; Zheng et al., 1997). Néanmoins, les souris invalidées pour le FGF2 ne présentent aucune anomalie de l'oreille interne (Carnicero et al., 2004). Le FGF3 est exprimé dans le ganglion cochléo-vestibulaire et ce dernier est de taille réduite chez les souris invalidées pour ce gène (Mansour et al., 1993). Par ailleurs, le FGF10 est exprimé dans le domaine proneural de l'épithélium otique et dans les neurones du ganglion cochléo-vestibulaire (Lillevali et al., 2006; Pirvola et al., 2000). Chez les souris *Fgf10*<sup>-/-</sup>, il existe une réduction sévère du nombre de neurones vestibulaires et auditifs (revu dans Chae et al., 2004).

- Les neurotrophines

La famille des neurotrophines, protéines basiques sécrétées, se compose du NGF (*nerve growth factor*),



du BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), de la NT-3 (neurotrophine 3) et la NT-4/5. Ces protéines sont essentielles pour la survie et la différenciation neuronale (revu par Bibel and Barde, 2000; Huang and Reichardt, 2001; Pirvola and Ylikoski, 2003). Leurs effets sont médiés par deux types de récepteurs, le récepteur p75<sup>NTR</sup> de faible affinité appartenant à la super famille des récepteurs du *Tumor Necrosis Factor*, et les récepteurs tyrosine kinase (Trk), récepteurs de haute affinité, spécifiques des différents



**Figure 9** : Représentation schématique de l'individualisation des crêtes neurales, véritable 4<sup>ème</sup> feuillet embryonnaire, lors de la formation du tube neural.

facteurs (TrkA/NGF, TrkB/BDNF et TrkC/NT-3) (Barrett, 2000; Casaccia-Bonnel et al., 1999; Chao and Bothwell, 2002; Lee et al., 2001). Dans l'épithélium sensoriel otique, seuls la NT-3 et le BDNF sont exprimés dans des régions non recouvrantes. Leur expression est également détectées hors de l'épithélium sensoriel dans les neuroblastes lors de la délamination (Farinas et al., 2001; Friedman et al., 2005). Leurs récepteurs, TrkB et TrkC sont exprimés par les neurones otiques de façon différentielle. Les neurones cochléaires dépendent de la NT-3 et expriment TrkC, tandis que les neurones vestibulaires expriment surtout TrkB et dépendent de BDNF pour leur survie et leur différenciation (revu dans Fritsch and Beisel, 2004). Chez les souris invalidées pour la NT-3 ou TrkC, la majorité des neurones auditifs meurt entre E13.5 et E15.5 (Ernfors et al., 1995; Farinas et al., 1994; Farinas et al., 2001; Liebl et al., 1997). Lorsque c'est l'expression de BDNF ou de TrkB qui est inactivée, ce sont les neurones

vestibulaires qui disparaissent (Bianchi et al., 1996; Fritsch et al., 1997b). Chez les animaux invalidés concomitamment pour l'expression de BDNF et de NT3, ou de TrkB et TrkC, c'est l'entièreté des neurones de l'oreille qui disparaît (Bianchi et al., 1996; Fritsch et al., 1998; Fritsch and Beisel, 2004; Pirvola and Ylikoski, 2003). Le développement et la survie des neurones du ganglion spiral dépendent donc des facteurs trophiques NT-3 et BDNF (revu dans Roehm and Hansen, 2005).

#### – GATA3

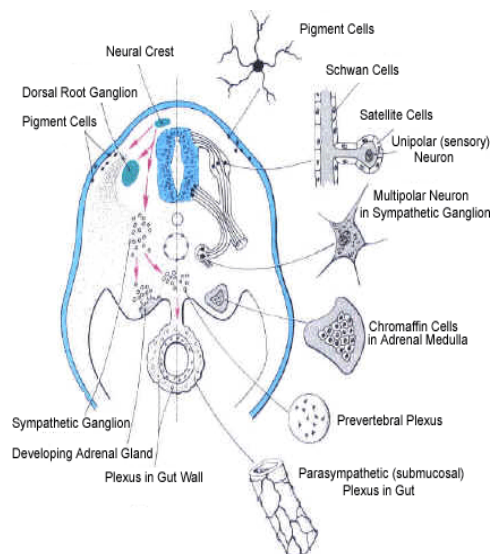
Outre leur rôle dans la morphogenèse précoce de l'oreille interne, certains facteurs sont impliqués également dans le développement des neurones otiques. C'est aussi le cas de GATA3 qui est exprimé dans l'oreille interne en développement au niveau des domaines sensoriels, des cellules épithéliales et des neurones auditifs (Lawoko-Kerali et al., 2002; Lillevali et al., 2004). A partir de E18.5, son expression se restreint à la cochlée. Comme déjà décrit, les souris *GATA3*<sup>-/-</sup> montrent une perte de la portion auditive du ganglion (Karis et al., 2001). Qui plus est, GATA3 régulerait sélectivement et

transitoirement l'expression de *NeuroD* dans les neuroblastes de la portion ventrale de la vésicule otique et serait impliqué dans le choix du destin auditif des neurones du ganglion cochléo-vestibulaire (Lawoko-Kerali et al., 2004). Ainsi, les neuroblastes qui n'expriment pas GATA3 sont destinés à devenir des neurones vestibulaires.

### 2.1.3 Cas particulier des crêtes neurales

Les cellules des crêtes neurales constituent lors du développement une population transitoire de cellules pluripotentes. Vers le 8<sup>em</sup> jour du développement embryonnaire chez la souris, ces cellules s'individualisent de la plaque neurale à la jonction du neuroderme et de l'ectoderme lors de la neurulation. Les bords latéraux de la plaque neurale prolifèrent, forment les bourrelets neuraux, excroissances destinées à former les crêtes neurales (Figure 9). Ces cellules sont pluripotentes et possèdent une capacité migratoire étonnante (Le Douarin and Dupin, 2003; Lillevali et al., 2006). Leur grande mobilité explique leur omniprésence dans l'organisme et leur permet de migrer au travers de tout l'embryon selon des voies de migration stéréotypées. Tant que les cellules des crêtes neurales sont en phase migratoire, elles conservent une certaine plasticité et peuvent choisir plusieurs voies de différenciation. Cependant, au cours du temps, une restriction de leur caractère pluripotent intervient (Anderson, 1989; Le Douarin N., 1980; Le Douarin and Dupin, 2003; Lillevali et al., 2006). En effet, la différenciation terminale de ces cellules est observée une fois qu'elles ont atteint leurs cibles définitives. C'est Le Douarin, qui par la technique de chimères caille-poulet a permis le développement d'études systématiques sur le lignage des cellules des crêtes neurales (Le Douarin, 1980). Dès 1970, on a pu identifier que ces cellules donnent naissance à un grand nombre de dérivés (Le Douarin and Teillet, 1973; Le Douarin, 1975), notamment de nombreux composants du système nerveux périphérique. Les neurones sensitifs primaires, les neurones multipolaires des ganglions sympathiques et parasympathiques, les neurones du système nerveux entérique, les cellules de Schwann du système nerveux périphérique, les cellules gliales satellite des ganglions sensitifs, mais aussi les mécanorécepteurs cutanés tels que les cellules de Merkel dérivent des crêtes neurales. Qui plus est, ces cellules se différencient également en cellules chromaffines de la médullo-surrénale et donnent aussi naissance à certaines cellules des os et du cartilage de la face ainsi qu'à l'entièreté de la lignée mélanocytaire (Anderson, 1997) (Figure 10). Au niveau de l'oreille interne, c'est dès le 10<sup>em</sup> jour gestationnel (E10), chez la souris, que les mélanoblastes commencent à coloniser le mésenchyme autour de l'otocyste. A la fin de la période embryonnaire, ils vont se restreindre à la strie vasculaire de la cochlée et aux régions des cellules sombres du vestibule. Dans le ganglion spiral, les précurseurs des cellules gliales migrent vraisemblablement en même temps que les neuroblastes, précurseurs des neurones auditifs sensoriels du ganglion cochléo-vestibulaire.

Le développement des cellules des crêtes neurales nécessite comme tout mécanisme développemental, des phénomènes de prolifération, de survie, de migration, de déterminisme et de différenciation cellulaire. Les gènes impliqués dans ces mécanismes sont de mieux en mieux connus, et parmi eux, on distingue les gènes *SoxE* de la famille Sox qui nous intéressent plus particulièrement. D'autres gènes sont aussi impliqués, tels que les gènes *FoxD3* (de la famille des facteurs de transcription winged-helix), des facteurs de transcription en doigt à Zn (*Slug/snail*), ou encore les gènes codant pour les neurégulines (NRGs) et ceux codant pour leurs récepteurs (ErbB). Des anomalies de migration, de



**Figure 10** : Représentation du devenir des cellules des crêtes neurales, issue de (Britsch, 2007).

prolifération ou de différenciation du développement de ces cellules sont connus. Elles forment un groupe hétérogène de maladies qui portent le nom générique de neurocristopathies, dont certaines peuvent être associées à des déficits auditifs.

## 2.2 Développement tardif de l'oreille interne

### 2.2.1 L'organe de Corti

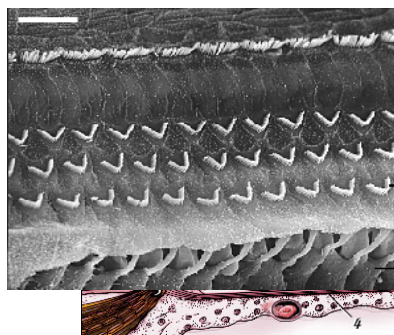
Alfonso Corti a décrit son organe éponyme dès 1851 (Corti A, 1851). Organe sensoriel de l'audition, l'organe de Corti se compose de cellules sensorielles, les cellules ciliées et de cellules de support, les cellules de soutien.

#### 2.2.1.1 Histologie et physiologie de l'organe de Corti

Les cellules ciliées sont divisées en deux types : les cellules ciliées internes et les cellules ciliées externes. Les cellules ciliées internes se répartissent sur une seule rangée tandis que les cellules ciliées externes sont disposées en trois rangées (Figure 11). Chez l'être humain, on dénombre approximativement 3500 cellules ciliées internes et 13000 cellules ciliées externes. Appelées ainsi suite

à la présence en leur surface apicale de stéréocils, les cellules ciliées sont les cellules sensorielles capables de détecter les vibrations sonores et de les transduire en un signal électrique au niveau de la synapse formée avec les dendrites des neurones auditifs.

Dérivant de la différenciation des cellules de l'épithélium du canal cochléaire, les cellules ciliées dérivent de cellules progénitrices qui leur sont communes avec les cellules de soutien (Forge et al., 1993; Kuntz and Oesterle, 1998a; Kuntz and Oesterle, 1998b; Li and Forge, 1997). L'organe de Corti est le siège d'une activité mitotique intense entre le douzième (E12) et le quatorzième (E14) jour de gestation chez la souris. Dès E14.5-E15.5, les cellules cessent de se diviser et acquièrent un statut post-mitotique (Ruben, 1967). Après cette période critique, sous l'influence de l'expression de différents gènes, tels *Atoh1* ou le système Notch, les cellules se différencient selon un gradient de maturation cochléaire baso-apical et médio-latéral. Les cellules basales atteignent ainsi un stade mature plus rapidement que les cellules apicales et les cellules ciliées internes se différencient plus rapidement que les cellules ciliées externes. Une fois l'état post-mitotique et différencié atteint, les cellules ciliées de la cochlée des mammifères, contrairement à celle des oiseaux ou encore à celles du système vestibulaire des mammifères (Corwin and Cotanche, 1988; Forge et al., 1993), sont incapables de renouvellement.



**Figure 12** : Image d'organe de Corti en coupe transversale. L'image illustre la disposition des cellules ciliées internes et externes, des cellules de soutien et de la membrane tectoriale. D'après "promenade autour de la cochlée".

Or, de nombreux événements sont susceptibles de les léser. L'administration de médicaments ototoxiques, les traumatismes sonores, ou bien les ischémies cochléaires transitoires entraînent une souffrance de ces cellules qui peut conduire à leur dégénérescence. A l'heure actuelle, leur perte est irréversible et compromet donc l'audition de certaines fréquences sonores.

Les stéréocils des cellules ciliées, fait de filaments d'actine, présentent une organisation au niveau du pôle apical des cellules hautement conservée. Leur développement est conduit par la polarité du kinocil, seul "vrai" cil fait de microtubules lors du développement embryonnaire, et disparaissant durant la période postnatale. Organisés en "V" sur la cellule ciliée interne, les stéréocils sont disposés en "W" sur les cellules ciliées externes et implantés dans la membrane tectoriale (Figure 12).

Ces stéréocils sont reliés entre eux par un filament protéique, le "tip-link", et possèdent des canaux potassiques mécano-sensibles. Lors de la déflexion des stéréocils vers l'extérieur de l'organe de Corti, ces canaux ioniques s'ouvrent, permettent l'entrée de  $K^+$  dans la cellule à partir de l'endolymphe,

déclenchant ainsi une dépolarisation cellulaire suivie d'une entrée intra-cellulaire de  $Ca^{2+}$ , via des canaux calciques voltages-dépendants. Ceci aboutit à la libération de glutamate, neurotransmetteur permettant la genèse d'un potentiel d'action au niveau des afférences nerveuses des neurones du ganglion spiral. Ainsi, on comprend le rôle critique de l'organisation des stéréocils pour une fonction auditive normale (Yoshida and Liberman, 1999). Le mécanisme morphogénétique qui sous-tend l'arrangement des stéréocils au niveau du pôle apical porte le nom de polarité planaire (Dabdoub and Kelley, 2005; Montcouquiol et al., 2003). Polarité orientée perpendiculairement à l'axe apico-basal des cellules épithéliales, la polarité planaire est un mécanisme qui a été initialement étudié chez la *Drosophile* et gouverné par des gènes spécifiques, les gènes *Drosophila Wingless (wg)* (Cadigan and Nusse, 1997; Nubler-Jung et al., 1987). Leurs homologues chez les vertébrés, les gènes *Wnt*, *Wingless int*, sont maintenant largement étudiés, notamment dans l'oreille interne et sont aussi impliqués dans la régulation des mécanismes d'extension convergente (Keller, 2002; Mlodzik, 2002; Montcouquiol et al., 2003). La polarité planaire est un mécanisme initialement découvert chez la *Drosophile* par Gubb et Garcia-Bellido (Gubb and Garcia-Bellido, 1982). Ils ont démontré qu'une série de gènes contrôlent la polarité des poils épidermiques, et de l'oeil à facettes (ou ommatidies) de la *Drosophile* selon un axe perpendiculaire à l'axe apico-basal. C'est la distribution polarisée de différentes protéines, telles que strabismus/van Gogh (*stbm/vang*), prickle (*pk*), frizzled (*fzd*), flamingo (*fmi*), dishevelled (*dvl*) et diego, qui définit des domaines de polarité opposée et donc l'établissement d'une orientation de la surface cellulaire (Axelrod et al., 1998; Axelrod, 2001; Strutt and Strutt, 2005; Tree et al., 2002a). Ces gènes, sont appelés les "core genes" et régulent la polarité planaire. Ainsi, sous l'influence de l'expression de ces gènes, les cellules épidermiques de l'aile de la *Drosophile* présentent une polarité planaire orientée selon un axe proximo-distal (Strutt et al., 2002). Il en est de même pour les yeux dont les ommatidies montrent un arrangement en miroir de part et d'autre de l'équateur séparant les parties ventrales et dorsales de l'oeil. La mutation de ces "core genes" affecte fortement la polarité planaire chez la *Drosophile*, quel que soit le tissu étudié (Klein and Mlodzik, 2005; Strutt et al., 2006; Tree et al., 2002b) (Tableau 1).

**Tableau 1** : Contrôle génétique de la polarité planaire de l'oreille interne des mammifères : relation avec les principaux gènes démontrés comme ayant un rôle dans la polarité planaire chez la *Drosophile* (*core genes*).

<b>Drosophile</b>	<b>Mammifères</b>	<b>Caractéristiques moléculaires</b>	<b>Références</b>
frizzled	frizzled	récepteur à sept domaines transmembranaires des ligands de la famille Wnt	(Wang et al., 2001b)
wnt	wnt7a	ligand de frizzled	(Dabdoub et al., 2003; Dabdoub and Kelley, 2005)

flamingo/starry night	Celsr1-3	récepteur à sept domaines transmembranaires de la superfamille des cadhérines	(Curtin et al., 2003;Shima et al., 2002)
diego	diego	protéine à 6 domaines ankyrine interagissant avec dishevelled	(Jenny et al., 2005)
strabismus/van gogh	vangl2	récepteur à quatre domaines transmembranaires contenant un domaine de liaison de type PDZ	(Montcouquiol et al., 2003;Montcouquiol et al., 2006b)
dishevelled	dishevelled 1-3	protéine cytoplasmique à domaine PDZ recrutée par frizzled	(Jenny et al., 2005;Wang et al., 2005)
prickle	prickle 1-2	protéine cytoplasmique interagissant avec dishevelled	(Mlodzik, 1999;Mlodzik, 2000)

Pour la plupart de ces gènes impliqués dans la polarité planaire chez la Drosophile, des homologues ont été identifiés chez les mammifères et sont également impliqués dans la polarité planaire et l'extension convergente. Leur voie principale de signalisation est la voie Wnt « non-canonique ». Dans cette voie de signalisation, un récepteur à sept domaines transmembranaires de type Frizzled recrute une protéine adaptatrice, Dishevelled, pour activer, de manière encore mal définie, la voie JNK-Rac-Rho ayant des répercussions sur des cibles cytosquelettiques (Fanto and McNeill, 2004;Habas et al., 2001;Habas et al., 2003;Strutt, 2003;Veeman et al., 2003).

Ainsi, les mutations des gènes Van Gogh like-2, *Vangl2*, orthologue de *Stbm*, chez la souris *loop tail* (Kibar et al., 2001;Montcouquiol et al., 2003), du gène *Scribble1*, homologue de *scribble* chez la Drosophile, chez la souris *circletail* (Montcouquiol et al., 2003), du gène *Celsr1*, orthologue de *Fmi*, chez les souris *Crash* et *Spin cycle* (Curtin et al., 2003), ou encore les souris invalidées pour les gènes *Fzd3* et *6* (Montcouquiol et al., 2006b;Wang et al., 2006a), aboutissent à des désorientations des stéréocils des cellules ciliées ainsi qu'à un raccourcissement et un élargissement de la cochlée suggérant un rôle de ces différents gènes non seulement dans la régulation de la polarité planaire, mais aussi dans la régulation de la croissance cochléaire par extension convergente.

Cependant, on retiendra que l'établissement de la polarité planaire et de l'extension convergente ne sont pas mutuellement dépendants. Les deux processus possèdent en effet des voies de signalisation communes, mais différent dans leurs effecteurs cellulaires et moléculaires.

D'un point de vue morphologique, chaque cellule ciliée repose sur une cellule de support spécifique, classée selon sa position et son ultrastructure, ayant pour terme générique "cellule de soutien". Les

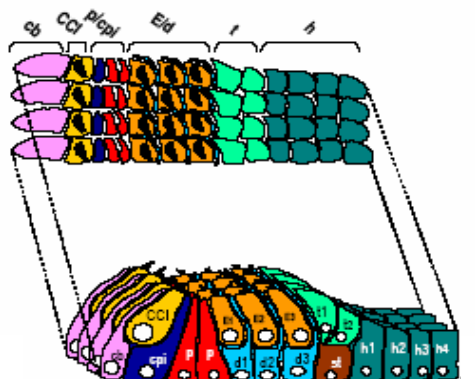
cellules ciliées internes reposent sur les cellules phalangéaires internes et les cellules ciliées externes sur les cellules de Deiters. Elles sont séparées par deux cellules piliers, interne et externe, qui déterminent entre elles le tunnel de Corti. Latéralement par rapport aux cellules ciliées externes, on décrit les cellules tectales et sous-tectales, et les cellules de Hensen (Lim and Rueda, 1992; Lim, 1986) (Figure 13).

Par ailleurs, à l'instar des cellules gliales du système nerveux, les cellules de soutien auraient également un rôle trophique vis-à-vis des cellules ciliées. En effet, *in vitro*, après une lésion traumatique des cellules ciliées, les cellules de soutien seraient capables de recréer un microenvironnement protecteur pour les cellules sensorielles (Sobkowicz et al., 1997). Qui plus est, elles partagent l'expression de certains marqueurs immunohistochimiques (Pack and Slepecky, 1995; Vega et al., 1999) ainsi que des similitudes morphologiques avec les cellules gliales (Rio et al., 2002). En effet, les cellules de soutien, possèdent une structure réalisant une protection autour des cellules ciliées qui englobe les fibres nerveuses afférentes démyélinisées, tout comme le font les cellules gliales dans le système nerveux. Outre ce rôle de soutien et de protection, des études récentes ont montré que suite à l'activation de certains gènes clés ou l'inhibition de certaines protéines, les cellules de soutien sont capables de se transdifférencier, c'est-à-dire se différencier en cellules ciliées sans avoir recours à une division préalable. Les cellules de Deiters (Daudet et al., 1998) ou les cellules de Hensen et les cellules piliers (Malgrange et al., 2002b; White et al., 2006) peuvent se différencier en cellules ciliées et constitueraient ainsi un pool de cellules progénitrices potentiellement capables de régénérer les cellules de l'organe de Corti.

#### 2.2.1.2 Gènes impliqués dans la différenciation de l'organe de Corti

- Les protéines du cycle cellulaire

Diverses protéines du cycle cellulaire sont largement exprimées dans les cellules progénitrices de l'organe de Corti. Ces protéines occupent une place unique dans la différenciation cellulaire puisqu'on leur connaît non seulement un rôle de contrôle du cycle cellulaire mais aussi un rôle dans le maintien à l'état quiescent d'une cellule postmitotique. Durant le développement, le contrôle du cycle cellulaire



**Figure 13** : Représentation schématique de la structure de l'organe de Corti embryonnaire en vue de surface d'une part et en vue transversale d'autre part. cb = cellule bordante, cci = cellule ciliée interne, cpi = cellule phalangéaire interne, p = cellule pilier, cce = cellule ciliée externe, d = cellule de Deiters, t = cellule tectale, st = cellule sous-tectales, h = cellule de Hensen. D'après (Malgrange et al., 2003).



s'effectue par des protéines, les cyclines et par des enzymes régulées par ces cyclines, des kinases dépendantes des cyclines (CDK). C'est par la liaison des complexes cyclines-CDK que les inhibiteurs de ces CDKs favorisent la sortie du cycle d'une cellule (Sherr and Roberts, 1999). A ce jour, deux familles d'inhibiteurs de CDK ont été décrites : la famille Ink4 (p16<sup>Ink4a</sup>, p15<sup>Ink4b</sup>, p18<sup>Ink4c</sup> et p19<sup>Ink4d</sup>) et la famille des Cip/Kip (p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> et p57<sup>KIP2</sup>) (Sherr and Roberts, 1995). Dans l'épithélium sensoriel de l'oreille interne, il a été démontré que de nombreuses protéines régulatrices du cycle cellulaire sont impliquées dans la sortie du cycle cellulaire et la différenciation qui s'en suit (Chen and Segil, 1999; Chen et al., 2003; Lee et al., 2006; Lowenheim et al., 1999; Malgrange et al., 2003). Notamment, p27<sup>KIP1</sup> semble jouer un rôle critique dans le déterminisme du destin cellulaire des progéniteurs de l'organe de Corti. Dans la cochlée des souris invalidées pour p27<sup>KIP1</sup>, on observe toujours des mitoses au sein de l'organe de Corti au-delà de la période normale de prolifération cellulaire (Chen and Segil, 1999; Lowenheim et al., 1999). Cette activité mitotique intense est observée au niveau des cellules de Hensen ou encore des cellules piliers. Dans notre laboratoire, l'inhibition pharmacologique des CDKs, et plus particulièrement de CDK2, a permis *in vitro* le développement de cellules ciliées surnuméraires ainsi que de leurs cellules de soutien correspondantes (Malgrange et al., 2003). Des expériences approfondies laissent penser que c'est à partir du pool de cellules de Hensen que cette différenciation est possible.

L'un des substrats clé des CDKs est la protéine du rétinoblastome (pRb) qui est inactivée par phosphorylation (Zhu and Skoultchi, 2001). Les signaux d'arrêt du cycle cellulaire convergent vers les trois membres de la famille de pRb (pRb, p130 et p107) directement, ou via les inhibiteurs du cycle cellulaire ou les complexes cyclines-CDK. Ainsi ces protéines sont au coeur du contrôle du cycle cellulaire, à la transition entre la phase G1 et la phase S. En l'absence des protéines pRb, les cellules semblent entrer en phase S de façon incontrôlée. A l'inverse l'expression ectopique des pRb induit l'arrêt du cycle cellulaire en fin de phase G1 (Xin et al., 2003). Les souris invalidées pour pRb n'étant pas viables, le rôle de pRb a été évalué dans des modèles transgéniques conditionnels, où la délétion de pRb s'adresse spécifiquement aux progéniteurs de l'oreille interne. Les souris porteuses d'un minigène *Rb*, *mgRb:Rb<sup>-/-</sup>*, où l'expression de pRb est nettement réduite, voire même absente de l'oreille interne (Mantela et al., 2005) et les souris mutantes conditionnelles, *Col1A1ARb<sup>-/-</sup>*, issues du croisement de souris *Rb<sup>loxp/loxp</sup>* avec des souris Collagène1A1-*cre* (Sage et al., 2005), présentent une prolifération cellulaire continue dans les cellules progénitrices de la zone sensorielle et dans les cellules de soutien lors de la période embryonnaire. Par ailleurs, leurs cellules ciliées différenciées continuent également à se diviser. Lors du développement embryonnaire, l'activité de pRb est donc essentielle à la sortie du cycle cellulaire dans l'épithélium sensoriel de l'oreille interne en développement (Sage et al., 2005). Pour étudier l'effet de pRb sur des cellules à des stades post-mitotiques, les souris *Brn3c-Rb<sup>-/-</sup>* ont été construites grâce à des souris qui expriment cette fois la cre-recombinase sous le contrôle du promoteur

de *Brn3c*. *Brn3c* (ou *Pou4f3*) est un facteur de transcription restreint aux cellules ciliées post-mitotiques et absent des progéniteurs en prolifération dans l'oreille interne (Xiang et al., 1998). Cette délétion conditionnelle conduit à la division des cellules ciliées et des cellules de soutien au-delà des stades post-nataux (Sage et al., 2006). Cependant après cette phase de prolifération cellulaire, une vague de mort cellulaire par apoptose survient (Sage et al., 2006), responsable *in fine* d'une surdité chez ces souris. De ces études, on retiendra principalement que ce sont des cellules p27<sup>KIP1</sup>-positives, les cellules de soutien, qui ré-entrent en cycle cellulaire. Ceci suggère que *Rb* peut donc surpasser la fonction de p27<sup>KIP1</sup> (Chen, 2006), élevant ainsi *Rb* au rang de cible potentielle dans le cadre de la régénération des cellules ciliées.

● Atoh1

*Atoh1* est un facteur de transcription de type bHLH (*basic Helix Loop Helix*) qui régule le développement de nombreux systèmes chez les vertébrés (Bermingham et al., 2001; Gazit et al., 2004; Yang et al., 2001). Homologue murin du gène atonal de la Drosophile, *Atoh1*, anciennement appelé *Math1*, est à la fois nécessaire et suffisant pour induire la différenciation des cellules ciliées de la cochlée des mammifères. L'absence d'*Atoh1* chez la souris conduit en effet à une absence totale de cellules ciliées (Bermingham et al., 1999), mais aussi à la perte de cellules de soutien (Woods et al., 2004). En outre, la surexpression *in vitro* d'*Atoh1* induit l'apparition de cellules ciliées surnuméraires ectopiques (Jones et al., 2006; Woods et al., 2004; Zheng and Gao, 2000). Ces cellules excédentaires proviennent en réalité de la transdifférenciation de cellules épithéliales non sensorielles localisées en dehors des cellules ciliées internes, dans la région appelée la GER (*greater epithelial ridge*). Par ailleurs, chez le cobaye, l'inoculation *in vivo* d'adénovirus porteurs du gène *Atoh1*, induit la genèse de cellules ciliées dans l'organe de corti lui-même ainsi que dans l'épithélium non sensoriel de l'oreille interne (Kawamoto et al., 2003). De plus, il a été montré que ces cellules ciliées ectopiques possédaient la capacité d'attirer les fibres nerveuses à leur contact. Dans le même ordre d'idée, une étude plus récente a montré une amélioration des potentiels évoqués auditifs chez des animaux rendus sourds par l'administration de drogues ototoxiques et transfectés par *Atoh1* (Izumikawa et al., 2005). Ces différentes études soulignent le rôle essentiel d'*Atoh1* dans le développement et la différenciation des cellules ciliées.

Cependant, une étude récente a remis en question l'absolue nécessité d'*Atoh1* dans la différenciation des cellules ciliées cochléaires (Du et al., 2007). L'étude d'organes de Corti de souris chimères sauvages et *Atoh1*<sup>-/-</sup>, a mis en évidence, que comme attendu, les cellules ciliées se développaient à partir des cellules progénitrices de souris sauvages, mais que plus étonnamment, les cellules progénitrices de souris *Atoh1*<sup>-/-</sup> étaient également capables de donner naissance à des cellules ciliées. Ces expériences suggèrent que la perte de *Atoh1* peut être compensée par des facteurs environnementaux. L'hypothèse émise dans cette étude est que les cellules ciliées différenciées provenant des souris sauvages, seraient

capables d'induire la différenciation de leurs cellules voisines, ceci en activant par exemple des voies de signalisation en aval d'*Atoh1*, telles que l'expression de *Brn3c*, de *Gfi1* ou encore des effecteurs de la voie Notch (Du et al., 2007; Wallis et al., 2003; Xiang et al., 1998).

- La voie Notch

Parmi les différents systèmes régulateurs du choix du destin cellulaire dans la cochlée, le système Notch joue un rôle essentiel. C'est par un mécanisme d'inhibition latérale que le système Notch régule le destin cellulaire des progéniteurs de cellules ciliées et de cellules de soutien (Lanford et al., 1999) (revu dans Lewis et al., 1998). Récepteur de surface membranaire, Notch est exprimé de façon ubiquitaire dans l'épithélium sensoriel durant la période embryonnaire. Ses ligands, Jagged 2 et Delta 1 sont exprimés exclusivement dans les cellules ciliées, suggérant que les cellules ciliées nouvellement différenciées sont capables d'activer le récepteur Notch dans leurs cellules voisines et d'en inhiber la différenciation en cellules ciliées. Ainsi, le phénotype cellulaire différencié par défaut des progéniteurs de l'organe de Corti serait donc la cellule ciliée. En corollaire, des anomalies de signalisation de la voie Notch conduisent à la production de cellules ciliées surnuméraires. La délétion de Jagged 2 ou de Delta 1 est responsable de la production de cellules ciliées en excès avec une diminution de la population de cellules de soutien correspondantes (Brooker et al., 2006; Kiernan et al., 2005; Lanford et al., 1999; Zine et al., 2000). De la même façon, l'inhibition d'un allèle Notch induit une augmentation significative du nombre de cellules ciliées (Kiernan et al., 2005; Lanford et al., 1999; Zine et al., 2000). Néanmoins, ce système est plus complexe qu'un système de régulation du destin cellulaire par inhibition latérale. En effet, la voie Notch possède aussi la capacité de sélectionner des lignages cellulaires spécifiques à partir de champ de cellules équivalentes. Notch agit alors en induisant ses ligands et ce mécanisme est alors connu sous le nom d'induction latérale. Chez les souris *Slalom* (Tsai et al., 2001) et *Headturner* (Kiernan et al., 2001) invalidées pour Jagged 1, un autre ligand du récepteur Notch, on observe une réduction du nombre de cellules ciliées et non pas un accroissement. Au lieu d'un mécanisme d'inhibition latérale, c'est donc cette notion d'induction latérale qui est proposée pour expliquer le rôle de Jagged1 (Brooker et al., 2006; Kiernan et al., 2006).

## 2.2.2 Le ganglion spiral

### 2.2.2.1 Histologie et physiologie du ganglion spiral

Formé à partir de l'otocyste, les neurones auditifs, neurones bipolaires, s'individualisent très tôt au cours du développement de l'oreille interne (E9.5 chez la souris) (D'Amico-Martel and Noden, 1983). Regroupés pour former le ganglion spiral, situé dans le modiolus, l'axe de la cochlée, on en distingue deux types : les neurones de type I, connectés aux cellules ciliées internes, et les neurones de type II, connectés aux cellules ciliées externes. Les neurones de type I sont des cellules à soma volumineux, myélinisées, au cytoplasme riche en organites, et représentent 90 à 95% de l'ensemble des neurones

du ganglion spiral. Chaque neurone de type I est connecté de façon spécifique à une cellule ciliée interne unique. D'une façon générale, une cellule ciliée interne est connectée à environ une dizaine de neurones. Les neurones de type II, sont plus petits et ne sont pas myélinisés. Chaque dendrite d'un neurone de type II est connecté à plusieurs cellules ciliées externes avec lesquelles ils font synapses. Au sein de ce ganglion, on identifie un autre type cellulaire, non neuronal, ne dérivant pas de la placode otique, les cellules de Schwann. Ces cellules entourent le corps cellulaire des neurones et dérivent des cellules des crêtes neurales (Le Douarin, 1984). Elles migrent lors du développement embryonnaire pour venir coloniser le ganglion et assurer la myélinisation de ses cellules nerveuses. Outre leur rôle dans la synthèse de la myéline, et donc dans la conduction de l'influx nerveux, les cellules gliales assurent un support métabolique aux neurones, elles créent une barrière perméable à certaines molécules, contrôlant ainsi l'environnement neuronal et l'espace extracellulaire du ganglion. Les cellules gliales sont également responsables du recyclage des substances toxiques pour les neurones (Hanani, 2005).

#### 2.2.2.2 Facteurs impliqués dans la survie des neurones du ganglion spiral

Le développement et la survie des neurones du ganglion spiral est intimement lié à l'établissement de leurs connexions aux cellules ciliées (Fekete and Campero, 2007). Ces dernières sont en effet connues pour être responsable de l'apport des facteurs trophiques nécessaires aux cellules ganglionnaires (Fritsch and Beisel, 1998; Rubel and Fritsch, 2002).

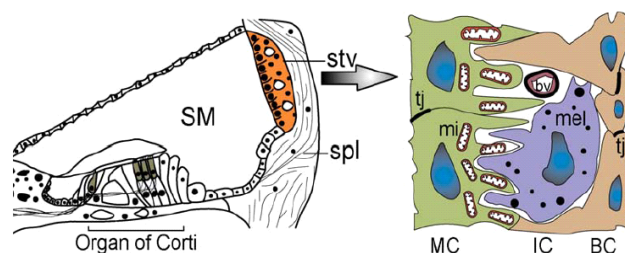
- Rôle des neurotrophines

Expérimentalement, il a été démontré qu'une fois séparés des noyaux cochléaires ou de l'organe de Corti, les neurones du ganglion spiral dégénèrent (Guild, 1931; Spoendlin, 1971). Ces résultats suggèrent que les cibles centrales et périphériques des neurones du ganglion spiral exercent sur eux une influence trophique. Chez le cobaye, la destruction des cellules ciliées par l'administration de médicaments ototoxiques provoque une dégénérescence neuronale (Bichler et al., 1983; Koitchev et al., 1982). Cette dégénérescence est en partie liée à une déprivation en facteurs trophiques diffusibles et est de nature apoptotique (Lallemend et al., 2003). Les neurotrophines, via leurs récepteurs Trk de haute affinité et le récepteur de faible affinité p75<sup>NTR</sup>, sont produites par les cellules ciliées durant la vie embryonnaire et adulte et sont connues pour être indispensables à la survie neuronale (Ernfors et al., 1992; Pirvola et al., 1994). De plus, les neurotrophines guident l'innervation des cellules ciliées et sont essentielles à l'établissement de la synaptogenèse. Dans le domaine de l'oreille interne, de nombreux travaux *in vitro* (Gillespie et al., 2001; Lefebvre et al., 1994; Malgrange et al., 1996) et *in vivo* (Miller et al., 1997; Shoji et al., 2000; Staecker et al., 1996) ont montré que le BDNF et la NT-3 sont les principales neurotrophines impliquées dans le développement, la survie et le maintien des neurones du ganglion spiral.

- Rôle des neurégulines

Outre le rôle des cellules ciliées, il a été montré plus récemment que les cellules de soutien contribueraient à la survie des neurones du ganglion spiral en l'absence de cellules ciliées (Xiang et al., 2003). Elles seraient également impliquées dans la survie des neurones auditifs via la voie de signalisation des neurégulines (NRGs) et de leurs récepteurs tyrosine kinase (ErbB) (Britsch, 2007). Les NRGs sont des membres de la famille des facteurs de croissance de type EGF (*Epidermal Growth Factor*) et la transduction de leur signal se fait par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires de la famille du récepteur à l'EGF que sont ErbB2, ErbB3 et ErbB4 (Falls, 2003). Les NRGs sont connues pour être des facteurs trophiques clés dans les interactions neurones-glie dans le système nerveux central et périphérique. Dans la cochlée, les cellules gliales et les cellules de soutien expriment les récepteurs ErbB2 et ErbB3, tandis que les neurones expriment la neuréguline de type 1 (NRG-1) (Hansen et al., 2001a; Hume et al., 2003; Stankovic et al., 2004). En activant ses récepteurs situés sur les cellules de soutien, NRG-1 stimulerait la production et la libération de NT-3 et *in fine* la survie des neurones du ganglion spiral (Stankovic et al., 2004).

### 2.2.3 La strie vasculaire



**Figure 14** : Représentation schématique de la strie vasculaire (SV) dans l'oreille interne et de son histologie tirée de (Jin et al., 2007). BC = cellule basale, IC = Cellule intermédiaire, MC = cellule marginale.

#### 2.2.3.1 Histologie et physiologie de la strie vasculaire

Responsable de la sécrétion d'endolymphe, la strie vasculaire, située à l'intérieur du ligament spiral, est composée de trois types cellulaires et de nombreux vaisseaux sanguins (Figure 14). Les cellules marginales, riches en mitochondries, forment une couche continue le long de la lumière du canal cochléaire. Les cellules basales forment une assise cellulaire accolée au ligament spiral vers l'extérieur de la rampe médiane. Ces deux types cellulaires dérivent de la placode otique et déterminent entre eux le compartiment intrastrial. Le troisième type cellulaire correspond aux cellules intermédiaires, cellules mélanocytaires situées entre les deux types cellulaires précédents (Figure 14). Ces cellules intermédiaires dérivent des cellules des crêtes neurales.

Les cellules de la strie vasculaire sont responsables de la sécrétion de potassium et de sa concentration

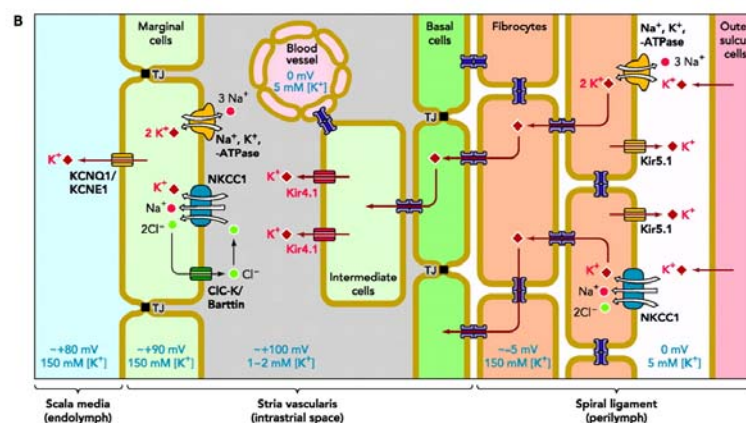
élevée dans l'endolymphe, générateur essentiel du potentiel endocochléaire de repos (Steel and Barkway, 1989; Tasaki and Spyropoulos, 1959). Ce potentiel endocochléaire est d'environ +80 mV et est généré par la sécrétion active de potassium du plasma vers l'endolymphe via des canaux ATP-dépendants. Divers facteurs exogènes ou endogènes, tels que des médicaments ototoxiques (diurétiques par exemple) ou des mutations génétiques sont susceptibles de compromettre le fonctionnement de la strie vasculaire, ce qui se traduit par un dysfonctionnement de l'oreille interne, et finalement un déficit auditif (Tran, 2002).

### 2.2.3.2 Homéostasie endolymphatique et balance ionique

La composition ionique de l'endolymphe est assurée par des transports actifs et des échanges d'ions au niveau de la strie vasculaire. La sécrétion, le transport, la capture et le recyclage du potassium sont des phénomènes essentiels à la transduction du son (revu par Hibino and Kurachi, 2006) (Figure 15). Ainsi, le rôle crucial du potassium, mais aussi de façon plus générale de la strie vasculaire dans l'audition est attesté par les nombreux exemples de surdités génétiques liées à des mutations des canaux potassiques ou des anomalies des cellules de la strie vasculaire telle que les mélanocytes cochléaires (Jin et al., 2007). De plus, dans ce système complexe de transport ionique, les jonctions serrées jouent également un rôle essentiel dans l'établissement d'une compartimentalisation entre les différents fluides de l'oreille interne.

- Les canaux potassiques et transporteurs ioniques

Le potentiel endocochléaire voit le jour grâce à la sécrétion de potassium au sein de la strie vasculaire. Récupérés par le système des jonctions communicantes des cellules basales et des cellules intermédiaires (voir paragraphe ci-dessous), les ions  $K^+$  diffusent à partir de la membrane apicale des cellules intermédiaires de la strie vasculaire via les canaux potassiques KCNJ10 (ou Kir4.1) (Ando and Takeuchi, 1999), canal potassique de la sous-famille J des canaux potassiques rectifiant entrant (*inwardly rectifying*) vers l'espace intrastrial (Sage and Marcus, 2001). Les souris invalidées pour le



**Figure 15** : Représentation schématique du transport du potassium au sein de la strie vasculaire tirée de (Hibino and Kurachi, 2006).

gène *kcnj10* présentent une diminution de la concentration  $K^+$  endolymphatique et sont incapables de générer un potentiel endocochléaire (Marcus et al., 2002). La capture de  $K^+$  par les cellules marginales se fait ensuite grâce aux transporteurs situés au niveau de leur membrane basolatérale, la  $Na^+/K^+$  ATPase et les cotransporteurs  $Na^+/K^+/2Cl^-$ , protéines codées par le gène *Slc12a2* (*Solute carrier family 12*) (Shibata et al., 2006; Wangemann, 2006). La mutation du gène *Slc12a2* est responsable d'une dysfonction à la fois auditive et vestibulaire, où l'on observe notamment un collapsus de la membrane de Reissner (Delpire et al., 1999; Dixon et al., 1999; Flagella et al., 1999; Pace et al., 2000). Enfin, ces cellules marginales sécrètent le  $K^+$  dans l'endolymphe via des canaux potassiques KCNQ1/KCNE1 (Canaux potassiques voltage-dépendants de la sous famille Q et E) situés à leur pôle apical (Casimiro et al., 2001; Lee et al., 2000b; Vetter et al., 1996). Chez la souris, la mutation du gène *kcnq1* ou *kcne1* est responsable d'un collapsus de la membrane de Reissner entraînant une diminution du volume endolymphatique et une dégénérescence de l'organe de Corti secondaire à ce collapsus (Casimiro et al., 2001; Drici et al., 1998; Lee et al., 2000b; Vetter et al., 1996).

Après stimulation sonore, le  $K^+$  pénètre dans les cellules ciliées par des canaux ioniques mécanosensibles situés sur les stéréocils, induisant leur dépolarisation. Les cellules ciliées via des canaux potassiques KCNQ4 (Canaux voltage dépendant de la sous famille Q) éliminent le  $K^+$  vers les cellules de soutien. La perte des canaux KCNQ4 empêche la sortie du  $K^+$  des ces cellules, qui s'accumule alors dans leur cytoplasme et induit leur dégénérescence (Jentsch, 2000; Kharkovets et al., 2000; Oliver et al., 2003). Ensuite, les cellules de Deiters vont être capables de récupérer ce  $K^+$  grâce à la présence d'un cotransporteur  $K^+/Cl^-$  produit par le gène *Slc12a7* (Boettger et al., 2002; Boettger et al., 2003) ainsi que par des canaux KCNJ10 (Hibino et al., 1997). Les souris invalidées pour le gène *Slc12a7* présentent des déficits auditifs suite à la dégénérescence des cellules ciliées (Boettger et al., 2002). Grâce à l'existence d'un réseau de jonctions communicantes, le  $K^+$  va pouvoir être recyclé et acheminé à nouveau vers la strie vasculaire (Kikuchi et al., 1995; Steel and Kros, 2001).

- Les protéines de jonctions
  - Les jonctions communicantes

Le système des jonctions communicantes (*gap junctions*) est essentiel à la recirculation du potassium cochléaire (Kikuchi et al., 1995). L'existence de ces jonctions, crée deux véritables réseaux de communications, l'un épithélial, connectant les cellules de soutien, les cellules épithéliales de la membrane basilaire et les cellules épithéliales du ligament spiral, l'autre conjonctif, unissant les fibrocytes du ligament spiral et les cellules basales et intermédiaires de la strie vasculaire. Ces réseaux permettent ainsi le passage de petites molécules et le recyclage des ions  $K^+$  (Kikuchi et al., 1995; Kikuchi et al., 2000).

Les connexines, sous-unités qui forment les jonctions communicantes, jouent un rôle important dans la communication intercellulaire (revu dans Kumar and Gilula, 1996). Les mutations des gènes codant



pour ces jonctions communicantes et leurs différentes sous-unités (les connexines, 26, 30, 31 et 43) sont responsables de surdité chez l'Homme et l'animal (Cohen-Salmon, 2005;Cohen-Salmon et al., 2007;Van Laer L. et al., 2001). Par exemple, la mutation de *Gjb2*, codant pour la connexine 26 est, chez l'Homme, la mutation responsable de la surdité héréditaire non syndromique la plus fréquente. Chez la souris, la mutation de *Gjb6*, codant pour la connexine 30, conduit à un déficit de génération du potentiel endocochléaire responsable secondairement de la dégénérescence de l'organe de Corti et d'une surdité profonde (Cohen-Salmon et al., 2007;Jan et al., 2004;Teubner et al., 2003).

#### – Les jonctions serrées

Nécessaires à l'établissement de la compartimentalisation entre la périlymphe et l'endolymphe, les jonctions serrées sont composées essentiellement de trois grandes familles de protéines : les occludines, les claudines et la tricelluline (Matter and Balda, 2003b;Matter and Balda, 2003a;Riazuddin et al., 2006b;Riazuddin et al., 2006a;Tsukita and Furuse, 2002). L'existence d'une part entre les cellules marginales et d'autre part entre les cellules basales de ce type de jonctions crée un espace extracellulaire nommé espace extrastrial (Kitajiri et al., 2004a;Kitajiri et al., 2004b). Cet espace contient de nombreux capillaires formés par des cellules endothéliales unies par d'autres jonctions serrées qui isolent ainsi le liquide intrastrial du compartiment sanguin (Ando and Takeuchi, 1998;Gratton and Schulte, 1995;Nakashima et al., 2003;Suzuki et al., 1998;Takeuchi and Ando, 1998;Takeuchi et al., 2001). Chez la souris, les cellules basales de la strie vasculaire sont unies par des jonctions serrées formées par la claudine 11 (*cldn-11*) tandis la claudine 14 (*cldn-14*) est exprimée par les cellules ciliées et les cellules de soutien. Il a été montré que les souris invalidées pour *cldn-11* présentaient une surdité sévère suite à une diminution du potentiel endocochléaire (Gow et al., 2004) alors que les souris invalidées pour *cldn-14* sont sourdes suite à une dégénérescence des cellules ciliées de l'organe de Corti lors des premières semaines de vie (Ben-Yosef et al., 2003).Chez l'Homme, la mutation de la *cldn-14*, cod e par le gène *cldn-14* est responsable d'une surdité autosomale récessive non-syndromique, DFNB29 (Friedman et al., 2000;Wilcox et al., 2001). Jonction serrée découverte récemment, la tricelluline, est exprimée dans l'épithélium cochléaire à la jonction entre les cellules ciliées et les cellules de soutien et participe à l'établissement de la lame réticulaire (Ikenouchi et al., 2005;Riazuddin et al., 2006a). Chez l'Homme, sa mutation conduit à une surdité non syndromique, DFNB49 (Riazuddin et al., 2006b).

#### ● Rôle spécifique des mélanocytes cochléaires

Requises pour le développement normal de la cochlée, les cellules intermédiaires - ou mélanocytes - de la strie vasculaire dérivent des cellules des crêtes neurales. De nombreux gènes tels que *Mitf* ("*Microphthalmia associated transcription factor*"), *c-Kit* (proto-oncogène codant pour un récepteur membranaire de type tyrosine kinase) et *Pax3* ont été étudiés et sont connus pour être impliqués dans le développement des mélanocytes cochléaires (Hornyak et al., 2001;Tachibana, 2001). Des mutations de ces divers gènes peuvent dès lors être responsables d'un déficit auditif chez l'Homme ou l'animal

(Baynash et al., 1994; Hosoda et al., 1994; Steel and Barkway, 1989). Ainsi, *c-Kit* et son ligand (*Kitl*), sont nécessaires à la survie et/ou à la migration des précurseurs des mélanocytes (Wehrle-Haller, 2003). La mutation de ces gènes chez les animaux Dominant white spotting (*W*) (Mutation de *c-Kit*) et les souris Steel (*Sl*) (Mutation de *Kitl*) sont responsables d'une perte des mélanocytes cochléaires, compromettant ainsi l'audition de ces animaux (Cable et al., 1992; Cable et al., 1995; Schrott et al., 1990; Steel and Smith, 1992).

### 3 Les gènes Sox

#### 3.1 Introduction générale

Les facteurs de transcription de la famille Sox, acronyme de “*SRY*-like HMG box gene”, sont des acteurs majeurs du développement chez les vertébrés. Durant l'embryogenèse, ils contrôlent de nombreuses étapes de déterminisme, de prolifération et de différenciation cellulaire dans divers tissus. Ils sont notamment impliqués dans le développement du système nerveux, la morphogenèse osseuse, la formation des cellules pigmentaires, le développement du système immunitaire et surtout le déterminisme sexuel mâle, rôle principal de *SRY* - Sex determining region of the Y - premier membre de la famille, anciennement appelé testis-determining factor (Pevny and Lovell-Badge, 1997; Wegner, 1999). Les protéines Sox se lient à l'ADN grâce à leur domaine HMG (*High Mobility Group*) qui leur confère leur fonction de facteur de transcription. Leur domaine HMG, composé de 79 acides aminés, présente plus de 50% d'homologie avec le domaine HMG du facteur SRY (Kamachi et al., 2000). Ce domaine est hautement conservé parmi les facteurs Sox et reconnaît un motif heptamérique consensus 5'-(A/T) (A/T) CAA (A/T) G-3' (Collignon et al., 1996; Giese et al., 1992; Harley and Goodfellow, 1994; Harley et al., 1994). A l'heure actuelle, plus de 20 membres de la famille Sox ont été identifiés et sont classés en 10 sous-groupes, de la sous-famille A à J, en fonction de leur homologie de séquence, en dehors du domaine HMG (Bowles et al., 2000; Koopman et al., 2004).

##### 3.1.1 Liaison à l'ADN

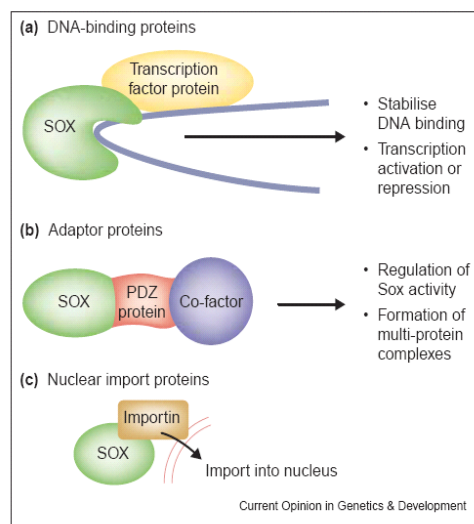
Les protéines Sox peuvent agir de plusieurs façons afin d'activer ou de réprimer la transcription de leurs gènes cibles, soit par simple liaison au niveau de l'ADN (*binding protein*), soit en instaurant une modification architecturale de la structure de l'ADN (*bending protein*). D'une façon générale, la plupart des facteurs Sox agissent comme activateurs de la transcription et possèdent un domaine de transactivation à leur extrémité carboxy-terminale.

###### 3.1.1.1 Binding protein

*In vitro*, en se liant à l'ADN, les facteurs Sox peuvent agir comme des facteurs de transcription classiques, dont la simple liaison au niveau du site promoteur ou de la séquence activatrice (*enhancer*) du gène cible induit ou réprime sa transcription.

###### 3.1.1.2 Bending protein

Les facteurs Sox sont capables de modifier l'architecture tridimensionnelle du brin d'ADN, en se liant à ce dernier le plus souvent sous forme de monomères et parfois de dimères (Kamachi et al., 2000; Peirano and Wegner, 2000; Wegner, 2005). Le domaine HMG possède une structure en "L", qui permet la liaison de la protéine Sox au niveau du petit sillon de l'hélice d'ADN, à l'inverse des autres



**Figure 16** : Différents types d'interactions protéiques possibles pour les facteurs Sox tiré de (Wilson and Koopman, 2002).

de stabiliser la liaison à l'ADN et d'induire ou de réprimer la transcription. La réorganisation de la chromatine peut en effet favoriser l'interaction avec d'autres facteurs et ainsi permettre l'activation de la transcription du gène cible. Dans d'autres situations, la courbure de l'ADN favorisera l'interaction avec un activateur de transcription situé à distance du complexe multiprotéique (Giese et al., 1992). *A contrario*, la modification de courbure peut également prévenir la liaison d'autres facteurs (Pevny and Lovell-Badge, 1997).

### 3.1.2 Protéines partenaires

Sachant que : 1/ les protéines Sox reconnaissent, grâce à leur domaine HMG, une séquence d'ADN similaire, 2/ de nombreuses protéines Sox d'une même famille partagent un étroit degré d'homologie de structure et 3/ de nombreuses protéines Sox sont exprimées dans un seul et même tissu et pourtant jouent des rôles différents, il fallait trouver une explication à la spécificité tissulaire de ces différents facteurs. En réalité, la spécificité d'action des protéines Sox dans un tissu donné est déterminée par la présence de protéines partenaires spécifiques. Les protéines Sox forment des complexes multiprotéiques au niveau des séquences promotrices ou activatrices de leur gène cible, qui déterminent la spécificité de chaque gène Sox (Wilson and Koopman, 2002). Les protéines Sox sont capables d'interagir avec des partenaires de différentes natures, telles que d'autres facteurs de transcription, des protéines adaptatrices, telles que les protéines PDZ par exemple (Pevny and Placzek, 2005; Poulat et al., 1997),

facteurs de transcription traditionnels qui se lient au niveau du grand sillon du brin d'ADN (van de Wetering M. and Clevers, 1992). Cette liaison induit une courbure de l'ADN variant de 30° à 110° (Connor et al., 1994; van de Wetering M. et al., 1993; Wegner, 1999), qui modifie la structure locale de la chromatine et facilite l'interaction de l'ADN avec d'autres protéines (Giese et al., 1992). *In vivo*, la liaison des protéines Sox à leurs cibles est insuffisante pour induire leur transcription, cette modification structurale pourra ainsi faciliter l'interaction avec d'autres facteurs de transcription ou d'autres protéines qui permettront

ou encore des protéines de transport nucléaire (Figure 16). Ces partenariats conduisent à l'élaboration de complexes multiprotéiques plus stables, transcriptionnellement actifs et spécifiques de certains gènes cibles (Kamachi et al., 2000). Ainsi, un même gène cible pourra, selon la présence de protéines partenaires différentes être activé ou réprimé (Wilson and Koopman, 2002).

Au vu la conservation du domaine HMG, il avait été postulé que l'interaction des protéines partenaires avec les protéines Sox se faisait hors de ce domaine. En réalité, l'association des protéines Sox avec d'autres protéines partenaires peut se faire soit au niveau du domaine HMG, soit sur des sites adjacents à ce domaine. En effet, de nombreux facteurs partenaires interagissent avec le domaine HMG des Sox. C'est le cas par exemple pour le facteur Sox10 et le gène Sp1/3 (facteur de transcription *Specificity Protein*) dans la régulation de l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  du récepteur nicotinique à l'acétylcholine (Melnikova et al., 2000a; Melnikova et al., 2000b). De la même façon, l'interaction avec des protéines partenaires peut se faire en dehors du domaine HMG comme les protéines PDZ, qui agissent en tant qu'adaptateur multiprotéique et se lient à l'extrémité carboxy-terminale des protéines Sox (Pevny and Placzek, 2005; Poulat et al., 1997). De plus, certaines protéines Sox sont capables de se dimériser via des sites situés en dehors de leur domaine HMG (Lefebvre et al., 1998; Peirano and Wegner, 2000; Schlierf et al., 2002; Takamatsu et al., 1995). C'est le cas des facteurs de la famille Sox D (Sox5 et Sox6), et Sox E (Sox8, Sox9 et Sox10), qui en se dimérisant augmente l'efficacité de la liaison à l'ADN (Lefebvre et al., 1998) et permettent l'établissement d'autres complexes multiprotéiques. Dans ce dernier cas de figure, la protéine partenaire considérée est alors la seconde protéine Sox.

### 3.1.3 Régulation des facteurs de transcription Sox

La fonction des facteurs de transcription Sox est modulable à plusieurs niveaux. Tout d'abord, leur propriété de navigation nucléocytoplasmique permet de contrôler leur localisation subcellulaire (Smith and Koopman, 2004). En effet, afin de réguler l'expression des gènes, les facteurs de transcription doivent être importés du cytoplasme vers le noyau. Or, en plus de sa capacité de liaison à l'ADN et à d'autres protéines partenaires, le domaine HMG possède un signal d'importation nucléaire. Ensuite, comme déjà mentionné ci-dessus, le partenariat des gènes Sox avec d'autres facteurs de transcription ou protéines, assure leur spécificité d'action au sein des différents types cellulaires. Enfin, des modifications post-traductionnelles régulent leurs activités transcriptionnelles (Akiyama et al., 2005; Komatsu et al., 2004).

#### 3.1.3.1 Signaux de transport intracellulaire

Après le processus de traduction, les protéines Sox entrent dans le noyau grâce à leur signal de localisation nucléaire (NLS, *nuclear localisation signal*). Le signal NLS, commun à tous les facteurs

Sox, est composé de courtes séquences nucléotidiques riches en acides aminés basiques, situées dans leur domaine HMG (Rehberg et al., 2002;Smith and Koopman, 2004). Ce signal NLS est reconnu par une famille de protéines transportrices appelée “importines” qui permettent ainsi la translocation des protéines Sox dans le noyau (Poulat et al., 1995;Sudbeck and Scherer, 1997).

Par ailleurs, pour les protéines SoxE, Sox8, 9 et 10, la présence conjointe d’un signal d’extrusion nucléaire (NES, *nuclear extrusion signal*), séquence généralement riche en acides aminés hydrophobes comme les leucines et les isoleucines, leur confère la propriété de naviguer entre le noyau et le cytoplasme en formant un complexe avec une “exportine”. Ceci fournit un mode de contrôle supplémentaire de leur activité (Rehberg et al., 2002;Smith and Koopman, 2004).

### 3.1.3.2 Partenariat protéique

Comme décrit ci-dessus, une fois dans le noyau, l’affinité du domaine HMG des Sox pour l’ADN est trop faible et ce n’est que leur partenariat spécifique avec d’autres facteurs de transcription ou protéines qui conduit à la formation des complexes nucléoprotéiques stables et transcriptionnellement actifs.

### 3.1.3.3 Modifications post-traductionnelles

Les protéines Sox subissent des modifications post-traductionnelles qui agissent sur leur activité à différents niveaux, en modifiant leur affinité pour l’ADN, en modulant leur activité transcriptionnelle, ou encore en contrôlant leur distribution nucléocytoplasmique. Parmi les modifications post-traductionnelles, la SUMOylation a été étudiée chez les facteurs Sox. Celle-ci consiste en l’attachement covalent et réversible d’un polypeptide de 97 acides aminés (SUMO, *small ubiquitin like modifier*) sur une lysine de la protéine cible. L’activité transcriptionnelle de nombreux facteurs de transcription est modulée par SUMOylation (revu dans (Hay, 2005;Hay, 2006;Hay, 2007). Ces modifications permettent d’inhiber (Fernandez-Lloris et al., 2006;Girdwood et al., 2003;Lyst and Stancheva, 2007) ou d’activer l’activité transcriptionnelle (Gostissa et al., 1999;Hong et al., 2001;Lyst and Stancheva, 2007) de ces facteurs Sox. Par exemple, l’activité de Sox9 et de Sox10 est régulée par la SUMOylation au cours du développement de l’oreille interne du Xenope (Gill, 2005;Taylor and Labonne, 2005). Dans ce cas, elle active l’activité transcriptionnelle de Sox9 et Sox10.

## 3.2 Les gènes SoxE

### 3.2.1 Introduction générale

Comprenant Sox8, Sox9 et Sox10, les gènes SoxE sont d’importants régulateurs de la formation des cellules dérivant des crêtes neurales. Ils possèdent les caractéristiques génétiques des membres de la famille Sox, un domaine HMG qui présente plus de 90% d’homologie entre les membres de ce sous-groupe et un domaine de transactivation (Bowles et al., 2000;Wegner, 1999). Sox9 et Sox10 partagent une structure exon/intron similaire, des homologies de séquences ainsi qu’une conservation de leur domaine de transactivation à leur extrémité carboxy-terminale (Pusch et al., 1998). On sait également

que les protéines SoxE sont capables de se dimériser via des résidus situés en amont du domaine HMG, région conservée chez les trois membres de cette famille. Ainsi, les facteurs SoxE peuvent se lier soit sous forme de monomères, soit sous forme de dimères à l'ADN. Selon leurs gènes cibles, on peut identifier des sites de liaison différents pour les facteurs Sox sous forme monomérique ou dimérique. Ceci joue un rôle important pour la fonction biologique des Sox, notamment, la liaison sous forme de dimère serait responsable d'un angle de courbure plus important que la liaison sous forme monomérique. Ce qui influencerait ainsi la formation de complexes multiprotéiques et l'activité transcriptionnelle de ses promoteurs cibles (Peirano and Wegner, 2000; Schlierf et al., 2002). Par exemple, la dimérisation de Sox10 lors de sa liaison au gène de la protéine P0 de la myéline, accroît la stabilité de la liaison avec l'ADN. D'une façon générale, les gènes SoxE agissent comme des activateurs de la transcription de leurs gènes cibles.

Au stade de la plaque neurale, Sox9 puis ultérieurement Sox10 sont exprimés par toutes les cellules dérivant des crêtes neurales (Aoki et al., 2003; Cheung and Briscoe, 2003; Cheung et al., 2005; Hong and Saint-Jeannet, 2005). Ensuite, lors du développement, l'expression de ces deux facteurs diverge. Sox9 se restreint aux cartilages de la face, et Sox10 aux cellules gliales et aux mélanoblastes. Sox9 possède une fonction essentielle dans la chondrogenèse et le déterminisme sexuel (Bi et al., 1999; Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994). Chez l'Homme, ses mutations conduisent à un syndrome de dysplasie campomélique (OMIM114290), trouble létal caractérisé par de sévères malformations squelettiques et chez certains individus de sexe masculin par une ambiguïté sexuelle (Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994). Parfois, une surdité peut être associée à ces symptômes (Savarirayan et al., 2003). Sox9 est un marqueur précoce de la placode otique du Xenope et son inhibition en empêche la formation (Saint-Germain et al., 2004). Chez la souris et le poisson zèbre, Sox9 est également exprimé dans l'épithélium otique (Li et al., 2002; Ng et al., 1997; Zhao et al., 1997). Par ailleurs, chez la souris, Sox10 est exprimé dans l'entièreté de l'épithélium de la vésicule otique au cours de son développement (Pusch et al., 1998) et son expression se restreint aux cellules de soutien au moment de la différenciation de l'organe de Corti (Watanabe et al., 2000). Sox8 est lui exprimé dans le système nerveux central, les reins, les gonades et encore les structures cranio-faciales lors du développement embryonnaire murin (Kennedy et al., 2008; Schepers et al., 2000). Il renforce l'activité de Sox9 dans le déterminisme sexuel m le ainsi que dans la spécification des oligodendrocytes (Chaboissier et al., 2004; Stolt et al., 2005). De la même façon, la mutation de Sox8 exacerbe le phénotype de la maladie de Hirschprung chez des souris invalidées pour le gène Sox10 (Maka et al., 2005).

Actuellement, les facteurs SoxE sont connus pour être exprimés concomitamment et impliqués dans le développement embryonnaire de nombreux tissus. Cette similitude d'expression, leur homologie de séquence, ainsi que de plus en plus d'études suggèrent l'existence d'une redondance fonctionnelle entre ces trois gènes (Kellerer et al., 2006; O'Donnell et al., 2006; Stolt et al., 2004).

### 3.2.2 Sox10

#### 3.2.2.1 Généralités

Appartenant à la sous famille SoxE, Sox10 est un facteur de transcription impliqué dans le développement, la survie et la différenciation des cellules dérivant des crêtes neurales et des progéniteurs d'oligodendrocytes, cellules myélinisantes du système nerveux central (Kuhlbrodt et al., 1998a; Southard-Smith et al., 1998). Cloné par l'équipe de M. Wegner à partir de lignées cellulaires gliales de rat (Kuhlbrodt et al., 1998a), Sox10 apparaît chez les vertébrés comme un facteur clé du développement des cellules dérivant des crêtes neurales (Aoki et al., 2003; Britsch et al., 2001; Cheung and Briscoe, 2003; Herbarth et al., 1998; Honore et al., 2003). En effet, il est nécessaire à leur survie, au maintien de leur pluripotentialité et inhibe leur différenciation neuronale (Kim et al., 2003; Paratore et al., 2002). Sox10 est particulièrement essentiel au développement de certaines lignées cellulaires telles que les mélanocytes, les cellules gliales du système nerveux périphérique et les neurones du système nerveux entérique (Britsch et al., 2001; Herbarth et al., 1998; Sonnenberg-Riethmacher et al., 2001). Dans l'organisme adulte, Sox10 continue d'être exprimé dans la glie périphérique et dans les oligodendrocytes, suggérant un rôle dans la survie à long terme et la différenciation de ces cellules (Kordes et al., 2005; Stolt et al., 2004; Wegner, 2001). De façon plus précise, Sox10 n'est pas nécessaire à l'initiation de la formation des cellules des crêtes neurales ni à leur migration. Par contre, il est essentiel à la survie de ces cellules à l'état indifférencié (Mollaaghababa and Pavan, 2003). De la même façon, Sox10 est essentiel à la différenciation des cellules progénitrices d'oligodendrocytes en oligodendrocytes myélinisants (Stolt et al., 2002).

D'un point de vue moléculaire, Sox10 possède deux domaines essentiels à sa fonction : le domaine HMG de liaison à l'ADN, d'environ 60% d'homologie de séquence avec le domaine HMG du gène SRY, et un domaine de transactivation à son extrémité carboxy-terminale, riche en résidus sérine, proline et glutamine (AA 400 - 460) (Pusch et al., 1998). La caractérisation de la séquence de liaison de Sox10 à l'ADN a permis d'identifier certains de ses nombreux gènes cibles. Il est important de noter qu'un même facteur peut dans certains cas agir comme partenaire de Sox10 et dans d'autres cas être son gène cible. Par exemple, dans les mélanocytes, Mitf (*Microphthalmia transcription factor*) peut être cofacteur de Sox10, dont leur gène cible sera le gène de la dopachrome tautomérase (Dct/Trp2), mais Mitf peut également être la cible de Sox10 lorsque ce dernier agit avec Pax3. Sox10 a donc la particularité d'agir sur des gènes cibles qui peuvent également interagir avec lui en tant que cofacteur.

#### 3.2.2.2 Gènes cibles

Parmi les gènes cibles de Sox10 (revus dans tableau 2), lors du développement des cellules gliales, le gène de la protéine P0 (MPZ, *Myelin Protein Zero*), protéine structurale de la myéline a été largement

étudié (Peirano et al., 2000). L'analyse de la région proximale du promoteur de gène P0 (Peirano et al., 2000; Peirano and Wegner, 2000) a permis l'identification de deux types de séquences de liaison ("*response element*"). Le site "B", qui permet la liaison de Sox10 sous forme monomérique, conforme à la séquence consensus heptamérique des facteurs Sox en général. Le second site, le site "C", qui permet la liaison de deux molécules Sox10 sous forme dimérisée (Schlierf et al., 2002). La fixation de Sox10 sous forme dimérisée à ses cibles améliorerait sa spécificité et sa stabilité (Mollaaghababa and Pavan, 2003). Le site "C" est composé de deux sites de liaisons adjacents séparés de quatre paires de bases et orientés l'un vers l'autre (C et C'). L'espace entre ces deux sites de liaison et leur orientation sont d'importants déterminants pour la dimérisation et la force de la liaison avec l'ADN. De plus, les séquences adjacentes influencent largement la liaison de Sox10 à ses gènes cibles. Un arrangement similaire est également retrouvé dans la région promotrice d'autres gènes tels que *Mitf*, *MBP* et la *Connexine 32* par exemple (Bondurand et al., 2001; Lee et al., 2000a; Stolt et al., 2002). Il a été montré que c'est la région amino-terminale qui précède le domaine HMG qui est nécessaire à la dimérisation de Sox10 (Peirano and Wegner, 2000; Schlierf et al., 2002).

Outre la régulation du gène de la protéine P0, protéine exprimée exclusivement dans les cellules de Schwann du système nerveux périphérique, le rôle critique de Sox10 dans la myélinisation du système nerveux peut être également expliqué par ses autres cibles. Le gène de la connexine 32, protéine des jonctions cellulaires communicantes, permettant la diffusion des molécules entre les différents feuilletts de la myéline (Bondurand et al., 2001) ou encore celui de la protéine basique de la myéline (*MBP*), ont en effet été identifiés comme des cibles de Sox10 (Peirano et al., 2000; Stolt et al., 2002; Stolt et al., 2004).

La protéine Sox10 régule en partenariat avec Pax3 - un gène paired box à homéodomaine impliqué dans le développement de l'oeil, de l'oreille et de la face - l'expression du gène *c-ret*, récepteur tyrosine kinase qui joue un rôle important dans la survie et la différenciation des précurseurs des neurones des ganglions entériques (Lang et al., 2000; Lang and Epstein, 2003; Paratore et al., 2002).

On retiendra également, dans le système nerveux périphérique, l'interaction de Sox10 avec le gène *ErbB3*, récepteur tyrosine kinase aux neurégulines de type EGF (Britsch et al., 2001). Ce gène est important dans le développement des cellules de Schwann dérivant des crêtes neurales et est également exprimé dans les cellules de soutien de l'organe de Corti (Stankovic et al., 2004).

Dans la lignée mélanocytaire, Sox10 régule directement l'expression du gène *Mitf* (Bondurand et al., 2000; Lee et al., 2000a). Il peut également s'associer avec ce dernier pour former un complexe stable et ainsi agir sur le promoteur du gène de la dopachrome tautomérase, *Dct/Trp2*, impliqué dans la synthèse de la mélanine (Bondurand et al., 2000; Jiao et al., 2004; Ludwig et al., 2004; Potterf et al., 2001).



**Tableau 2** : Gènes cibles de Sox10 et cofacteurs éventuels.

Gène cible	Cofacteurs éventuels	Tissu ou type cellulaire	Références
c-ret	Pax3	Système nerveux entérique	(Lang et al., 2000;Lang and Epstein, 2003;Paratore et al., 2002)
ErbB3		Cellules de Schwann et cellules de soutien de l'organe de Corti	(Britsch et al., 2001;Stolt et al., 2002)
Connexine 32	Krox20 Pax3	Cellules gliales	(Bondurand et al., 2001;Kuhlbrodt et al., 1998a;Wilson and Koopman, 2002)
Gène de la protéine P0		Cellules gliales	(Peirano et al., 2000)
Sous-unité $\beta 4$ du récepteur nicotinique à l'acétylcholine	Sp1/3	Système nerveux périphérique	(Melnikova et al., 2000a;Melnikova et al., 2000b;Wilson and Koopman, 2002)
Mitf	Pax3 CREB	Mélanocytes	(Bondurand et al., 2000;Lee et al., 2000a;Wegner, 2005)
Dct/Trp2	Mitf	Mélanocytes	(Ludwig et al., 2004;Potterf et al., 2001)

### 3.2.2.3 Mutations de Sox10

Des mutations du gène SOX10 chez l'Homme conduisent à une anomalie des cellules dérivant des crêtes neurales. Elles sont à l'origine du syndrome de Waardenburg-Shah (OMIM 277580) et de certains cas de Waardenburg de type II (Bondurand et al., 2007). Le syndrome de Waardenburg, associe des défauts de pigmentation à une surdité neurosensorielle. On en distingue quatre types, et parmi eux, le type IV, ou syndrome de Waardenburg-Shah. C'est un syndrome génétique rare, qui associe une maladie de Hirschprung (aganglionose colique distale) aux symptômes du syndrome de Waardenburg (Badner and Chakravarti, 1990;Badner et al., 1990;Pingault et al., 1998;Shah et al., 1981). Les troubles de la pigmentation peuvent se caractériser par des taches blanches cutanées, une mèche de cheveux blancs, un grisonnement prématuré des cheveux ou encore une hétérochromie irienne. Comptant pour 2 à 3% des surdités de l'enfant, le déficit auditif classiquement décrit dans ce syndrome est une surdité neurosensorielle modérée à importante, uni ou bilatérale, affectant les patients selon une pénétrance variable. Trois gènes sont connus pour être responsables de ce syndrome. Les gènes de l'endothéline 3 (EDN3) et de son récepteur de type B (EDNRB) pour lesquels la transmission de la maladie est

autosomale récessive ou le gène SOX10 pour lequel la transmission se fait selon un mode autosomal dominant (Amiel et al., 1996;Edery et al., 1996;Inoue et al., 2004;Pingault et al., 1998;Pingault et al., 2000). Des mutations spécifiques de SOX10 conduisent également à un variant neurologique du Waardenburg-Shah, connu sous l'acronyme "PCWH" (*Peripheral demyelinating neuropathy, Central dysmyelinating leukodystrophy, Waardenburg syndrome and Hirschprung disease*) (OMIM 609136) (Inoue et al., 1999;Inoue et al., 2002;Inoue et al., 2004;Pingault et al., 2000;Touraine et al., 2000). Il existe un modèle murin du syndrome de Waardenburg-Shah, la souris Sox10<sup>Dom</sup> (B6C3Fe a/a-Sox10Dom/J). Résultant d'une mutation spontanée responsable d'un glissement du cadre de lecture, la souris Sox10<sup>Dom</sup> (*Dominant megacolon*) présente, elle aussi, une aganglionose colique et des troubles de la pigmentation (Herbarth et al., 1998;Southard-Smith et al., 1999).

#### 4 But du travail

Notre travail vise à une meilleure compréhension du développement de l'oreille interne, véritable prémice nécessaire pour élucider les bases moléculaires et génétiques des déficits auditifs neurosensoriels qu'ils soient héréditaires ou acquis. Comprendre comment certains gènes sont responsables d'anomalies de la cochlée permettrait, en effet, d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de restaurer une audition compromise par une atteinte jusqu'à présent irréversible des composants cellulaires de l'oreille interne. Ainsi, nous diviserons en deux versants ce présent travail. Le premier qui concerne le développement de la structure sensorielle de l'oreille interne, l'organe de Corti, s'attachera d'une part au rôle du facteur de transcription Sox10 dans le développement des progéniteurs de l'oreille interne et d'autre part à l'étude de la différenciation des premières cellules de l'organe de Corti. Le second concerne le développement et la régénération des cellules du ganglion spiral et comprend lui aussi deux volets. L'un s'appliquera à étudier le rôle de Sox10 sur la capacité de développement des cellules embryonnaires du ganglion spiral, les neurones et les cellules de Schwann. L'autre concerne les mécanismes de régénération neuronale en condition de lésions réalisées *in vitro* ainsi que l'exploration du rôle de la périphérine dans les neurones auditifs. Ces deux pôles, évoluant *a priori* dans des sphères de travail différentes ont pour ligne d'horizon commune de toujours converger vers la restauration de la fonction auditive par l'induction d'une régénération, qu'elle soit de l'épithélium sensoriel et de ses cellules, ou encore des neurones du ganglion spiral. Cette étude vise à une meilleure compréhension du développement de l'oreille interne, qui permettrait à son tour de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la régénération ou l'absence de régénération des divers composants cellulaires de l'oreille interne, sachant que de nombreuses molécules qui contrôlent l'organogenèse au cours du développement sont souvent activées

ou impliquées dans les phénomènes de régénération tissulaire après un traumatisme y compris à l'échelle de l'oreille interne (Levic et al., 2007).

## Introduction

La première partie de ce travail porte sur l'étude des différents aspects du développement des cellules du canal cochléaire et des cellules ciliées. Elle s'inscrit dans l'optique générale de ce mémoire qui consiste en l'application potentielle de ces processus développementaux à l'étude des mécanismes capables d'induire la différenciation et la régénération des cellules de la cochlée des mammifères.

C'est par l'étude d'un modèle animal d'une pathologie humaine affectant l'audition, l'homologue phénotypique de la souris Sox10<sup>Dom</sup>, la souris Sox10<sup>lacZ</sup> que nous avons entrepris d'étudier le rôle du facteur de transcription Sox10 lors du développement de l'oreille interne. La souris Sox10<sup>lacZ</sup> résulte de manipulations génétiques, où la séquence LacZ remplace entièrement la séquence codante du gène Sox10 et est donc soumise à l'influence de son promoteur. La séquence LacZ, isolée chez *E. Coli*, code pour une  $\beta$ -galactosidase dont la révélation de l'activité enzymatique mime l'expression endogène de Sox10. Les souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup> présentent une absence complète de cellules gliales dans les ganglions rachidiens et le long des axones. Au contraire des cellules satellites et des précurseurs de cellules de Schwann, les neurones des ganglions rachidiens sont formés en nombre normal, mais dégèrent ensuite (Britsch et al., 2001; Kapur, 1999; Paratore et al., 2001; Sonnenberg-Riethmacher et al., 2001). De la même façon, on assiste à une réduction du nombre de mélanoblastes, responsable d'une diminution du nombre de mélanocytes. Celle-ci se traduit par des troubles de la pigmentation caractérisés par une zone de pelage blanc sur la face ventrale de l'animal. Vraisemblablement suite à une anomalie du développement du système nerveux autonome, les animaux homozygotes, Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>, ne survivent pas au-delà de la période embryonnaire. Homologue phénotypique de la souris Sox10<sup>Dom</sup>, cette souris nous a permis d'étudier le rôle du facteur de transcription Sox10 dans le développement de l'organe de Corti d'une part et dans le ganglion spiral d'autre part, dans la deuxième partie de notre travail.

Après avoir étudié le profil d'expression du facteur de transcription Sox10 dans l'oreille interne mature et embryonnaire, nous avons étudié le développement de cette dernière en son absence chez les souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>. Ce faisant, nous avons mis en évidence un rôle précoce de Sox10 dans le déterminisme du pool de cellules progénitrices du canal cochléaire. A des stades ultérieurs du développement, la structure cellulaire parfaitement conservée de l'organe de Corti nous laisse penser que l'action de Sox10 est compensée par d'autres gènes du groupe SoxE, Sox8 et Sox9, dont nous avons mis en évidence l'expression dans les cellules de soutien de l'organe de Corti.

# Résultats

## 1 Expression de Sox10 dans l'oreille interne en développement

Grâce à la révélation de l'activité enzymatique de la  $\beta$ -galactosidase chez les souris Sox10<sup>lacZ/+</sup>, nous avons étudié la distribution tissulaire de Sox10 dans l'oreille interne en développement. Dès la formation de la placode otique (E8.5) et lors de la formation de l'otocyste, Sox10 est exprimé. A ces stades précoces du développement (entre E8.5 et E11.5) nous n'avons pas observé de différence significative entre les animaux hétérozygotes et homozygotes, suggérant que le rôle de Sox10 aux stades d'induction et de développement de la placode otique est limité ou compensé par les autres facteurs du groupe SoxE, Sox8 et/ou Sox9. En effet, chez le Xénope, nous savons que Sox9 est exprimé précocement dès la formation de la placode otique (Saint-Germain et al., 2004). Sur coupes histologiques, nous avons constaté que l'expression de Sox10 est ubiquitaire dans l'épithélium de la placode otique. Certaines cellules du ganglion cochléo-vestibulaire puis du ganglion spiral expriment également Sox10. Qui plus est, Sox10 est aussi exprimé dans le futur épithélium vestibulaire. Lors de la phase tardive du développement embryonnaire, à partir de E16.5, moment de différenciation des cellules de l'organe de Corti, l'expression de Sox10 se restreint selon un gradient baso-apical aux cellules de soutien. Ainsi, l'évolution de l'expression de Sox10 dans l'organe de Corti suit le gradient de différenciation baso-apical des cellules ciliées. En effet, à E16.5, l'expression de Sox10 disparaît des cellules ciliées néodifférenciées du tour basal de la cochlée tandis que les cellules des tours médians et apicaux restent Sox10-positives. A la naissance, dans l'organe de Corti, Sox10 est définitivement restreint aux cellules de soutien.

D'une façon générale, lors du développement embryonnaire, Sox10 est donc exprimé dans toutes les cellules épithéliales du canal cochléaire, les cellules de la *greater epithelial ridge* (GER), de la *lesser epithelial ridge* (LER), les cellules épithéliales de la future membrane de Reissner, et les cellules de la future strie vasculaire. Par contre, dans l'oreille interne adulte, Sox10 est restreint aux cellules de soutien de l'organe de Corti, à certaines cellules de la strie vasculaire ainsi qu'à certaines cellules du ganglion spiral.

## 2 Croissance cochléaire

Les souris Sox10<sup>lacZ/+</sup> ayant permis de définir le profil d'expression développemental de Sox10 dans l'épithélium du canal cochléaire, nous avons entrepris d'étudier la morphologie et le développement tardif de l'oreille interne en son absence chez les souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>. Cependant, suite à des troubles du fonctionnement du système nerveux autonome, la mutation du gène Sox10 à l'état homozygote est létale. Cette contrainte inhérente à la mutation du gène d'intérêt ne nous a permis d'étudier le

développement de l'oreille en l'absence de Sox10 que jusqu'à l'âge embryonnaire E18.5 puisque les souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup> meurent à la naissance.

Durant l'embryogenèse, nous avons comparé la morphologie des oreilles internes des souris sauvages, Sox10<sup>lacZ/+</sup> et Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup> par la technique de "paint-filling", technique qui permet de visualiser des altérations de la morphologie structurale de l'oreille interne (Bissonnette and Fekete, 1996). D'une façon générale, l'oreille interne des souris hétérozygotes et homozygotes présente une morphologie grossière normale, le vestibule est correctement développé et la cochlée est présente chez les animaux des deux génotypes. Néanmoins, celle-ci apparaît moins bien développée chez les animaux homozygotes. L'anomalie constatée au niveau de la cochlée des animaux Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup> consiste en un raccourcissement de la longueur du canal cochléaire, nous laissant initialement penser que les souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup> pouvaient présenter un défaut d'extension convergente.

Pour confirmer ces résultats, la photographie d'oreilles internes *in toto*, suivie de la dissection et de la mesure de la longueur d'explants d'organe de Corti et de ganglion spiral nous ont permis de montrer que les souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup> présentaient effectivement une cochlée plus petite que leurs homologues du même âge sauvages et hétérozygotes. L'évaluation de la longueur des explants d'organe de Corti aux âges de E15.5, E16.5, et E17.5, nous a confirmé l'impression globale de raccourcissement visualisée en "paint-filling". Dès E15.5, la longueur des explants des souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup> est en effet réduite de façon statistiquement significative chez ces animaux par rapport à celle des souris sauvages ou hétérozygotes. Qui plus est, au fur et à mesure du développement tardif, nous avons également observé une stagnation de la croissance cochléaire en l'absence de Sox10 par comparaison avec les souris sauvages. Cette observation signifie que le raccourcissement de longueur observé chez les animaux invalidés pour le gène Sox10, ne consiste pas en un simple retard de croissance, mais bien en un arrêt de celle-ci. Afin d'étudier les causes de ces anomalies de longueur et de croissance, notre attention s'est portée sur d'éventuelles modifications de la prolifération et/ou de la mort cellulaire dans le canal cochléaire.

- La prolifération cellulaire a été étudiée dans la cochlée, au stade de la période normale de prolifération à E12.5, par recensement des cellules marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'histone H3 phosphorylée (phospho-Histone H3), marqueur de la phase M de la mitose des cellules eucaryotes sur des coupes de cochlées de souris sauvages, Sox10<sup>lacZ/+</sup> et Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>.

- Par ailleurs, nous avons également quantifié l'apoptose par la méthode TUNEL (*Terminal transferase dUTP nick end labeling*) qui identifie la fragmentation de l'ADN et par l'étude de l'activation de protéases spécifiquement impliquées dans l'apoptose (la caspase-3 notamment) dans les cochlées de ces mêmes souris sauvages, Sox10<sup>lacZ/+</sup> et Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup> à E12.5.

Ces expériences montrent que dans l'épithélium du canal cochléaire, future cochlée, la prolifération cellulaire est stable et ce indépendamment du génotype étudié, tandis que la mort cellulaire est

significativement accrue dans le canal cochléaire des souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>. Ainsi, ces expériences nous permettent de conclure que la population de cellules progénitrices dans le canal cochléaire est réduite chez les animaux Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup> par rapport aux souris sauvages du même âge, expliquant le raccourcissement cochléaire observé. Ces résultats sous-tendent l'idée que Sox10 serait donc un facteur important pour le développement du pool des progéniteurs cellulaires de l'oreille interne lors du développement embryonnaire précoce.

### 3 Caractérisation immunologique des cellules qui expriment Sox10

La révélation de l'activité  $\beta$ -galactosidase ayant montré que Sox10 était exprimé dans l'entièreté de l'épithélium du canal cochléaire, puis progressivement restreint aux cellules de soutien de l'organe de Corti et aux mélanocytes de la strie vasculaire, nous avons voulu caractériser le phénotype immunologique de ces cellules. Les doubles immuno-marquages en fluorescence nous ont permis d'identifier avec précision les cellules qui expriment Sox10 au niveau du canal cochléaire. Pour ce faire, nous avons utilisés différents anticorps spécifiques des principaux types cellulaires : l'anticorps anti-p27<sup>KIP1</sup>, spécifique des cellules de soutien de l'organe de Corti, les anticorps anti-myosineVI et anti-parvalbumine, spécifiques des cellules ciliées de l'organe de Corti et l'anticorps anti-HMB-45 permettant de mettre en évidence les mélanocytes cochléaires.

Grâce à la mise en évidence de la  $\beta$ -galactosidase par réaction d'immunofluorescence aux stades précoces du développement (E12.5 - E14.5), nous avons confirmé la présence de Sox10 dans tous les progéniteurs de l'organe de Corti. Grâce à l'anticorps p27<sup>KIP1</sup>, protéine inhibitrice des cyclines dépendantes des kinases, exprimée de façon spécifique dans le noyau des cellules de soutien, nous avons mis en évidence les cellules de soutien de l'organe de Corti. Après l'initiation de la phase de différenciation de l'organe de Corti, vers E16.5, une colocalisation du marquage  $\beta$ -galactosidase/p27<sup>KIP1</sup> est visualisée, confirmant ainsi que Sox10 est bien présent dans les cellules de soutien de l'organe de Corti. Par ailleurs, des doubles immunomarquages parvalbumine/ $\beta$ -galactosidase, nous ont permis de confirmer l'absence de Sox10 dans les cellules ciliées différenciées. En effet, la parvalbumine, protéine de liaison du Ca<sup>2+</sup> exprimée dans une sous-population d'interneurones GABAergiques du système nerveux central est également spécifique des cellules ciliées cochléaires différenciées (Hackney et al., 2005; Pack and Slepecky, 1995). Son absence de colocalisation avec la  $\beta$ -galactosidase nous a donc conforté sur la restriction de l'expression de Sox10 aux seules cellules de soutien dans l'organe de Corti révélée précédemment par l'activité  $\beta$ -galactosidase mais aussi par hybridation *in situ* (Watanabe et al., 2000). Toujours à l'échelle cellulaire, au niveau de la strie vasculaire, épithélium sécrétant responsable du potentiel endocochléaire de l'oreille interne, nous avons mis en évidence grâce à l'anticorps HMB-45, Human Melanoma Black, chez des embryons à l'âge de E17.5, la présence de mélanocytes, appelés dans la cochlée, cellules intermédiaires. Ces cellules, qui dérivent des crêtes neurales, sont présentes

dans la strie vasculaire des animaux hétérozygotes et expriment Sox10 comme le démontrent des doubles immunomarquages HMB-45/ $\beta$ -galactosidase. Ces cellules sont par ailleurs absentes de la strie vasculaire des animaux homozygotes. En outre, quels que soient les stades embryonnaires étudiés, nous retiendrons surtout que toutes les cellules qui composent la strie vasculaire expriment également Sox10.

#### 4 Cytoarchitecture de l'organe de Corti

Histologiquement, l'organe de Corti des souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup> est parfaitement constitué. Alternant une rangée de cellules ciliées internes et trois rangées de cellules ciliées externes reposant sur leurs cellules de soutien correspondantes, l'organe de Corti des souris des trois génotypes, sauvages, Sox10<sup>lacZ/+</sup> et Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>, est développé à l'identique. Que ce soit sur des images de révélation d'activité  $\beta$ -galactosidase, en immunofluorescence, grâce à des marquages parvalbumine, lhx3 et myosineVI, toutes protéines spécifiques des cellules ciliées, ou encore en coupes semi-fines, nous avons constaté que la cytoarchitecture de l'organe de Corti était parfaitement conservée. En l'absence de Sox10, la rigoureuse alternance cellule ciliée-cellule de soutien est parfaitement respectée. Sachant que nous avons montré qu'il existe un raccourcissement de la longueur cochléaire et que par ailleurs l'évaluation de la densité en cellules ciliées sur explant est identique selon les génotypes, nous pouvons conclure qu'il existe une diminution du nombre de cellules ciliées et de cellules de soutien dans la cochlée des animaux invalidées pour le gène Sox10. Parallèlement, afin d'explorer plus précisément la conservation de cette organisation, mais surtout d'étudier la polarité planaire chez les souris invalidées pour Sox10, nous avons réalisés des expériences de microscopie électronique à balayage. En effet, l'organisation des stéréocils du pôle apical des cellules ciliées est sous-tendue par un mécanisme connu sous le nom de polarité planaire, processus développemental gouverné par des gènes qui régulent également l'extension convergente. Initialement, lors de nos expériences, au vu de l'observation du raccourcissement de longueur de la cochlée, nous avons postulé un défaut possible de la croissance cochléaire par extension convergente. L'orientation parfaite des stéréocils indépendamment du génotype examiné, sur des organe de Corti à l'âge embryonnaire de E17.5, nous a permis d'infirmer un rôle éventuel de Sox10 dans le contrôle de la polarité planaire, et ainsi par extrapolation dans l'extension convergente.

#### 5 Compensation génique

Sachant que de nombreuses études montrent une redondance fonctionnelle entre les différents facteurs Sox du groupeE (Kellerer et al., 2006;Stolt et al., 2004) et afin d'expliquer par une éventuelle compensation génique l'absence d'altération structurelle dans l'organe de Corti des animaux invalidés pour Sox10, nous avons mis en évidence l'expression de Sox9 dans les cellules de l'épithélium sensoriel. Sox9 est exprimé très tôt au cours du développement de l'oreille par toutes les cellules de



l'épithélium cochléaire, et dès E16.5, son expression se restreint aux cellules de soutien de l'organe de Corti. Par technique d'immunohistochimie, malheureusement, nous n'avons pas pu mettre en évidence le facteur Sox8. Néanmoins, ces observations en immunofluorescence nous permettent d'émettre l'hypothèse que l'absence de Sox10 dans l'épithélium sensoriel pourrait être compensée par la présence de cet autre facteur, mais éventuellement aussi par Sox8. En corollaire, ces résultats suggèrent que Sox10, ainsi que les autres facteurs du groupe SoxE, pourraient avoir un rôle dans le déterminisme cellulaire de l'organe de Corti.

## **6 Cible de Sox10 dans l'épithélium prosensoriel**

Par hybridation *in situ*, nous avons mis en évidence l'expression d'ErbB3, cible connue de Sox10 (Britsch et al., 2001) dans l'épithélium prosensoriel du canal cochléaire chez des embryons à E13.5. Ce récepteur des neurégulines (revu dans Britsch, 2007), est exprimé de façon graduelle dans l'épithélium du canal cochléaire des animaux des trois génotypes. D'expression large et intense dans l'épithélium prosensoriel et adjacent de la souris sauvage, son niveau d'expression décroît au fur et à mesure que le nombre de copies Sox10 diminue. D'expression réduite chez la souris Sox10<sup>lacZ/+</sup>, ErbB3 est quasi absent, mais pas complètement, de l'épithélium cochléaire de la souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>.

## Discussion

### 1 Sox10 et développement précoce

Lors de ce travail, nous avons montré que Sox10 est largement exprimé dans l'oreille interne en développement. A l'instar des cellules des crêtes neurales qui expriment toutes Sox10 au cours du développement et dont l'expression se restreint aux cellules gliales et aux mélanocytes (Britsch et al., 2001), Sox10 est présent de façon ubiquitaire dès la formation de la placode et de la vésicule otique, puis se restreint à certains types cellulaires dans l'oreille interne aux stades tardifs du développement embryonnaire.

L'absence de retard de formation de la placode ou de la vésicule otique, permet de conclure que bien que son expression soit précoce, Sox10 n'est pas indispensable à l'induction et à la morphogenèse de la placode otique. Par ailleurs, nous avons également montré que l'absence de Sox10 conduit à une diminution de la population de cellules progénitrices du canal cochléaire aboutissant à une réduction de la longueur de la cochlée. Ce résultat suggère que Sox10 joue un rôle primordial dans le déterminisme du pool de cellules progénitrices de l'oreille interne et *in fine* dans le déterminisme du nombre de cellules ciliées et de cellules de soutien de l'organe de Corti. Nos résultats montrent que cette diminution du pool de cellules du canal cochléaire en croissance est liée à un accroissement de la mort cellulaire par apoptose dans le canal cochléaire au stade prolifératif et non pas à une réduction de la prolifération cellulaire comme le montrent nos marquages du contingent de cellules en cycle. Croyant initialement en un défaut d'extension convergente, croissance cochléaire par réarrangement cellulaire (Keller, 2002), nous avons postulé que Sox10 était susceptible d'interagir avec des gènes contrôlant la polarité planaire puisque les mécanismes qui régulent l'extension convergente sont directement reliés aux gènes qui contrôlent l'orientation des stéréocils de la surface apicale des cellules ciliées (Mlodzik, 2002; Montcouquiol et al., 2003). La réduction du pool de progéniteurs cochléaires, de même que les expériences de microscopie électronique à balayage, nous ont permis d'infirmer cette hypothèse. Afin d'expliquer cette réduction du nombre de cellules progénitrices, nous tenons à en revenir aux différentes cibles de Sox10. Nous savons qu'ErbB3 est une des cibles de Sox10 dans le système nerveux périphérique (Britsch et al., 2001). Bien que son rôle ne soit pas clairement établi dans l'épithélium du canal cochléaire, nous savons qu'ErbB3 est exprimé dans les cellules de soutien de l'organe de Corti (Stankovic et al., 2004). Pouvant jouer un rôle trophique précoce sur les cellules progénitrices du domaine prosensoriel, l'absence de Sox10, et en conséquence d'expression d'ErbB3, pourrait expliquer que Sox10 soit impliqué dans l'établissement du pool des progéniteurs cellulaires de l'organe de Corti. Toutefois, cette réflexion reste une hypothèse, d'autres cibles de Sox10, encore indéterminées à l'heure actuelle, pourraient également être impliquées dans l'établissement de la population des cellules progénitrices de l'organe de Corti. De plus, une étude clinique rétrospective,

portant sur l'analyse de CT-scan de rocher de patients pédiatriques atteints du syndrome de Waardenburg, dont la mutation de Sox10 peut être une étiologie, montre que la longueur du modiolus, axe central de la cochlée, est réduite (Madden et al., 2003). Bien qu'en accord avec nos résultats, cette étude ainsi que d'autres, montrent également des anomalies vestibulaires, telles un aqueduc vestibulaire large ainsi que des atteintes des canaux semi-circulaires que nous n'avons jamais observées chez nos animaux (Bondurand et al., 2007; Madden et al., 2003; Marcus, 1968).

## 2 Sox10 et destin cellulaire dans l'épithélium cochléaire

A l'échelle cellulaire, le développement de l'organe de Corti comporte deux phases. Une phase de prolifération cellulaire, entre E12.5 et E14.5, où l'expression de Sox10 est ubiquitaire dans les cellules progénitrices de l'organe de Corti et une phase de différenciation cellulaire, où une restriction progressive de l'expression de Sox10 est observée. Dès lors, il était légitime de penser que Sox10 pouvait jouer un rôle dans le déterminisme du destin cellulaire de l'épithélium sensoriel de l'organe de Corti. Cependant, la conservation de l'organisation histologique de l'organe de Corti des souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup> ne nous a pas permis de confirmer un rôle de Sox10 dans la différenciation et le déterminisme des cellules ciliées et des cellules de soutien. Qui plus est, nous ne pouvons pas exclure que dans les animaux invalidés pour le gène Sox10, il existe une substitution de l'activité de Sox10 par un autre facteur de transcription Sox du groupe E, à savoir Sox8 ou Sox9. En effet, il a été démontré à plusieurs reprises, que ces gènes du même groupe et exprimés dans un même tissu pouvaient partiellement ou complètement compenser la perte de l'expression d'un de leur membre et ainsi permettre l'expression d'un phénotype normal malgré l'absence de l'un d'entre eux (Cook et al., 2005; Kellerer et al., 2006; Sock et al., 2001; Stolt et al., 2004). Cette compensation pourrait expliquer l'absence de phénotype particulier observé au niveau des cellules dérivées de la vésicule otique des souris invalidées pour Sox10. En effet, nos travaux montrent que Sox9 est exprimé au sein des cellules de soutien de l'organe de Corti, confortant l'hypothèse d'une redondance fonctionnelle permettant de compenser l'absence de Sox10 chez les animaux Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup> (Taylor and Labonne, 2005).

Par ailleurs, on retiendra qu'il est classiquement décrit que les patients souffrant du syndrome de Waardenburg ainsi que leurs modèles animaux, présentent un déficit auditif lié à une absence de mélanocytes dans l'oreille interne (Iwamoto et al., 1992; Merchant et al., 2001; Tachibana et al., 2003; Takasaki et al., 2000). La perte des cellules intermédiaires de la strie vasculaire se traduirait par des anomalies du potentiel endolymphatique, responsables d'un collapsus endolymphatique conduisant à la dégénérescence des cellules ciliées de l'organe de Corti (Steel and Barkway, 1989; Tachibana, 1999; Tachibana et al., 2003; Takasaki et al., 2000). Il en va de même chez les souris JF1, autre modèle murin des syndromes de Waardenburg de type II et IV, où l'on observe également une dégénérescence de l'organe de Corti (Kikkawa et al., 2001; Koide et al., 1998; Tachibana et al., 2003). Cependant, il est

intéressant de remarquer que chez la souris  $Sox10^{Dom}$ , véritable modèle murin du syndrome de Waardenburg-Shah lié à une mutation de  $Sox10$ , on observe à l'âge adulte une agénésie de l'organe de Corti malgré la présence de mélanocytes cochléaires (Tachibana et al., 2003). De plus, récemment, il a été montré chez la souris  $Sox10^{Dom}$ , qu'entre la période embryonnaire tardive (E18) et post-natale précoce (P4), les cellules ciliées étaient bien présentes et correctement organisées sur des organes de Corti en explants, suggérant non pas une agénésie de l'organe de Corti, mais plutôt une atrophie ultérieure des cellules ciliées chez cette souris (Stanchina et al., 2006). Étonnamment, chez les souris invalidées pour le gène  $Sox10$ , nous n'observons pas de dégénérescence des cellules ciliées à l'âge adulte. La cytoarchitecture de l'organe de Corti des souris  $Sox10^{lacZ/+}$  embryonnaires et adultes, mais aussi des souris  $Sox10^{lacZ/lacZ}$  embryonnaires, est parfaitement conservée. Lors de nos expériences en immunofluorescence, nous avons par ailleurs également montré que les mélanocytes cochléaires étaient présents chez les animaux  $Sox10^{lacZ/+}$  jusqu'à l'âge adulte comme chez la souris  $Sox10^{Dom}$ .

La différence observée dans l'organe de Corti des souris  $Sox10^{Dom}$  par rapport au souris  $Sox10^{lacZ/+}$  pourrait trouver explication dans les mutations génétiques qui sous-tendent l'existence de ces souris. La souris  $Sox10^{Dom}$ , résulte d'une mutation spontanée responsable d'un glissement du cadre de lecture de la séquence  $Sox10$ , tandis que la souris  $Sox10^{lacZ}$  a été obtenue par recombinaison homologue. Récemment, une étude génétique a montré que des mutations du gène  $Sox10$  conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée étaient plus délétères que des délétions de ce gène (Bondurand et al., 2007). L'effet pathologique de la mutation de  $Sox10$  chez la souris  $Sox10^{Dom}$  résulte de la protéine nouvellement traduite qui exerce un effet dominant négatif (Kuhlbrodt et al., 1998b; Pingault et al., 1998; Southard-Smith et al., 1999) tandis que dans le modèle  $Sox10^{lacZ}$ , la protéine  $Sox10$  n'est pas exprimée et les anomalies observées résultent d'une haploinsuffisance. Ceci permet d'émettre l'hypothèse qu'en cas d'haploinsuffisance, le manque de  $Sox10$  peut être compensé par les facteurs  $Sox8$  et  $Sox9$  par exemple, alors que dans le modèle de la souris  $Sox10^{Dom}$ , la protéine à effet dominant négatif pourrait également interférer avec les fonctions des autres facteurs du groupe  $SoxE$  (Bondurand et al., 2007), se traduisant ainsi par un phénotype plus sévère chez la souris  $Sox10^{Dom}$  que chez la souris  $Sox10^{lacZ}$ .

## Conclusion

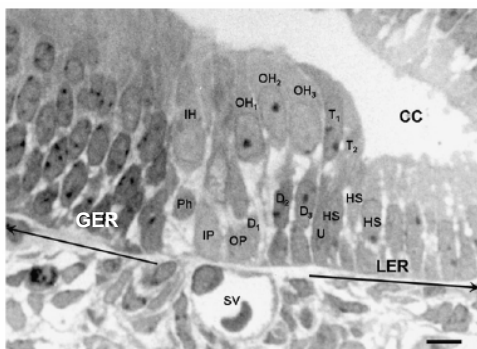
En conclusion, nous avons montré que dans l'épithélium cochléaire, en l'absence de Sox10, les cellules dérivées des crêtes neurales, à savoir les mélanocytes cochléaires sont absentes, soulignant le caractère dépendant de ces cellules au gène Sox10. Par ailleurs, nous avons également montré que l'absence de Sox10 conduit à une diminution de la population de cellules progénitrices du canal cochléaire ce qui aboutit à une réduction de la longueur de la cochlée et à une diminution du nombre total de cellules ciliées et de cellules de soutien. Ce résultat suggère que Sox10 joue un rôle primordial dans le déterminisme du pool de cellules progénitrices de l'oreille interne. Cependant, à des stades ultérieurs de développement, la structure parfaitement conservée de l'organe de Corti nous laisse penser que l'action de Sox10 est compensée par d'autres gènes du groupe SoxE, Sox8 et Sox9, dont nous avons mis en évidence l'expression dans les cellules de soutien de l'organe de Corti.

Ainsi, Sox10 n'apparaît pas comme un facteur indispensable à l'induction et au développement de la placode otique. Néanmoins, il joue un rôle important dans le développement précoce des cellules de l'oreille interne, particulièrement dans la détermination du pool de progéniteurs cellulaires. De plus, la présence de Sox10 est essentielle au développement des cellules cochléaires dérivées des crêtes neurales, que sont ici les cellules intermédiaires.

Ces constatations s'inscrivent dans la perspective développementale de notre travail. En effet, la compréhension des mécanismes qui régulent l'embryogenèse et la morphogenèse constitue une des clés de notre but final de régénération des cellules de l'oreille interne. Sox10, et par extrapolation l'ensemble des gènes SoxE, pourraient donc être impliqués dans la régulation du nombre de cellules progénitrices de l'organe de Corti, hypothèse qui ouvre la porte sur une perspective nouvelle du rôle de ces facteurs de transcription dans le développement de l'oreille interne.

## Introduction

Afin de progresser dans la connaissance des étapes du développement de l'organe de Corti, nous avons étudié de façon précise les différentes phases de sa différenciation cellulaire lors de la période embryonnaire tardive. Nos observations réalisées lors de ce travail, convergent vers un rôle central joué par la cellule pilier interne. Cette dernière serait impliquée dans la différenciation et la mise en place



**Figure 17** : Coupe transversale à travers un organe de Corti de rat à l'âge de E19. GER = greater epithelial ridge; LER = lesser epithelial ridge; IH = cellule ciliée interne; OH = cellule ciliée externe.

des différents types cellulaires de l'organe de Corti. Lors du développement embryonnaire, l'épithélium du canal cochléaire subit des modifications structurales. Dès le seizième jour de vie chez la souris, on peut voir se différencier deux crêtes cellulaires, la *greater epithelial ridge* (GER) dans la partie médiale du canal cochléaire et qui représente les deux tiers de l'épithélium et la *lesser epithelial ridge* (LER), dans la partie latérale, qui constitue la partie restante de l'épithélium (Figure 17).

Par ailleurs, il a été largement décrit que lors du développement de la portion auditive de la souris, entre E12.5 et E14.4, s'individualise une zone dans l'épithélium cochléaire, exprimant spécifiquement  $p27^{KIP1}$ , qui correspond aux cellules ayant quitté le cycle cellulaire (Chen and Segil, 1999; Lee et al., 2006). Cette zone particulière, qui est appelée la zone non proliférante (ZNP), contient le pool de cellules prêtes à se différencier et à former les cellules de l'organe de Corti. Par des techniques d'immunohistologie, de cytochimie et de microscopie électronique, nous avons mis en évidence que la première phase de différenciation dans l'épithélium du canal cochléaire consistait en l'élaboration de la GER et de la LER (Kelley M, 2001; Weibel, 1957). Or, jusqu'à présent, on ne savait pas si la différenciation de ces deux régions précédait ou suivait l'initiation de la différenciation cellulaire de l'organe de Corti. En corollaire, la localisation de la ZNP (Chen and Segil, 1999) par rapport à ces deux régions histologiques n'était pas bien définie non plus. Lors de ce travail, nous avons montré que l'organe de Corti se développait à partir de la ZNP et que cette région aurait la particularité de se trouver à la jonction entre la GER et la LER. De plus, nous confirmons que la différenciation cellulaire de l'organe de Corti suit un double gradient, baso-apical mais aussi médio-latéral. Nous avons également montré que la première cellule identifiable de l'organe de Corti est la cellule pilier interne, cellule de soutien qui se trouve en contact étroit avec la cellule ciliée interne. De plus, des résultats d'immuno-marquages en fluorescence suggèrent que le développement de cette cellule pilier interne est indépendant de la voie de signalisation Notch. Cette

constatation revêt une importance cruciale quand on connaît le rôle de l'inhibition latérale joué par Notch dans le développement de l'épithélium sensoriel auditif.

## Résultats

### **1 Morphologie et ultrastructure de l'organe de Corti de rat de 16 jours à 19 jours (E16-E19) de vie embryonnaire**

Nos observations sur coupes semi-fines et ultra-fines de cochlées embryonnaires de rats, nous ont permis de constater que dans la portion basale de la cochlée, la GER et la LER s'individualisent dès E16. A cet âge, l'épithélium du canal cochléaire est pseudostratifié et séparé en deux régions par une dépression. La GER, qui occupe les trois-quarts de l'épithélium du canal cochléaire, formée de 5 à 6 couches de noyaux, s'individualise du côté médial de l'épithélium du canal cochléaire, tandis que la LER s'identifie du côté latéral et est formée de 3 à 4 couches nucléaires. Sur coupes ultra-fines, des microvillosités sont observées à la surface de toutes les cellules, mais celles-ci sont de taille variable. Les cellules de la GER et quelques cellules les plus internes de la LER possèdent des microvillosités plus hautes et plus nombreuses. A cet âge, aucun organe de Corti ne peut être identifié.

Au fur et à mesure du développement, la GER et la LER s'individualisent dans les autres niveaux de la cochlée, c'est-à-dire, dans les tours moyens et apicaux respectivement également à E16 et à E18. Au niveau basal, le nombre de couches nucléaires se réduit et à partir de E17, une cellule de transition, qui occupe toute la hauteur de l'épithélium, est identifiable entre la GER et la LER.

Observée en microscopie électronique, cette cellule présente la particularité de posséder dans son cytoplasme supranucléaire de nombreux espaces formés d'un matériel non contrasté de nature indéterminée. Toujours à E17, sur base de la position de leur noyau, quelques rares futures cellules ciliées internes sont également identifiables au niveau du tour basal de la cochlée dans la partie latérale de la GER, la plus proche de la LER. Finalement, à E18, les cellules ciliées internes et externes sont mises en évidence au niveau des tours basaux et moyens de la cochlée. Observées en microscopie électronique, ces cellules possèdent d'ailleurs une plaque cuticulaire et des stéréocils immatures, critères morphologiques spécifiques des cellules ciliées. Au 19<sup>em</sup> jour de vie embryonnaire chez le rat, ce qui correspond à la fin de la période embryonnaire, les cellules de l'apex de la cochlée ne sont toujours pas différenciées.

### **2 Localisation du domaine prosensoriel**

L'organe de Corti se différencie à partir des cellules de la ZNP p27<sup>KIP1</sup>-positives. A E16, cette zone de cellules exprimant p27<sup>KIP1</sup> se situe dans la région de transition GER/LER et dès que les cellules ciliées sont différenciées, l'expression de p27<sup>KIP1</sup> disparaît. Par contre, une fois différenciées, les cellules de soutien restent positives pour p27<sup>KIP1</sup>.

### 3 Caractérisation de la première cellule identifiable de l'organe de Corti

Grâce à la technique d'immunofluorescence, nous avons entrepris la caractérisation du phénotype des cellules se différenciant dans l'organe de Corti en développement. Ainsi, les cellules ciliées, identifiées par l'anticorps anti-myosine VI, ne sont pas marquées avant E18 (Hasson and Mooseker, 1997). De la même façon, les cellules de soutien, marquées par l'anticorps anti-S100A1, spécifique des cellules ciliées internes, cellules phalangéaires internes et cellules de Deiters (Coppens et al., 2001) ne sont pas non plus visibles avant E18. La constatation de la présence d'un matériel peu contrasté dans le cytoplasme des cellules piliers internes à E19 mais également dans le cytoplasme de la première cellule de l'organe de Corti identifiable, nous a amené à penser que cette cellule pourrait être la cellule pilier interne. Le marquage anti-p75<sup>NGFR</sup>, récepteur de faible affinité aux neurotrophines (Sano et al., 2001), marqueur de la cellule pilier interne, s'est avéré positif dans certaines cellules de soutien de l'organe de Corti (Mueller et al., 2002) et se restreint spécifiquement à la cellule pilier interne à E18. La mise en évidence des polysaccharides par la méthode de coloration à l'acide périodique-thiocarbohydrazide-protéinate d'argent (Thiery, 1967), nous a permis de confirmer la présence d'un précipité noir sur la première cellule identifiable à E16, cellule située au niveau de la dépression limitrophe entre la GER et la LER. A E19, la présence d'un précipité d'argent nous a permis de marquer spécifiquement la cellule pilier interne.

### 4 Voie de signalisation Notch

Dans l'oreille interne, la voie Notch gouverne l'alternance des cellules ciliées et cellules de soutien via un mécanisme connu sous le nom d'inhibition latérale (Brooker et al., 2006; Lanford et al., 1999) (Cf introduction paragraphe 2.2.1.2.). En effet, par cette voie de signalisation, une cellule ciliée différenciée est capable, par l'activation de Notch, d'inhiber la différenciation d'une cellule adjacente en cellule ciliée et de favoriser ainsi l'acquisition d'un phénotype de cellule de soutien. Des doubles immunomarquages contre la forme active du domaine intra-cellulaire de Notch1 et contre p27<sup>KIP1</sup>, ont révélé que Notch1 activé était présent dans toutes les cellules de soutien de l'organe de Corti à l'exception de la cellule pilier interne.

## Discussion



## 1 Le domaine prosensoriel

Chez le rat, les cellules différenciées de l'organe de Corti sont identifiables à partir de E18 selon un gradient de maturation baso-apical (Anniko, 1983;Lim and Anniko, 1985;Sher, 1971). De plus, avant l'apparition de l'organe de Corti, l'épithélium du canal cochléaire se différencie en deux régions, la GER et la LER, séparées par une dépression. Le domaine prosensoriel, également appelé ZNP, à partir duquel vont se développer les cellules de l'organe de Corti, se situe dans la zone de transition entre ces deux régions. Les cellules ciliées, qui se développent à partir de ce domaine prosensoriel, sont identifiées à partir de E18 à la base de la cochlée et se différencient selon deux gradients de maturation, le premier baso-apical, le second médio-latéral, c'est-à-dire de la cellule ciliée interne vers les cellules ciliées externes (Kelley, 2006).

Jusqu'ici, il était postulé que les cellules ciliées provenaient de la LER et/ou de la GER (Chen and Segil, 1999;Lim and Anniko, 1985;Pearson, 1975). Lors de ce travail, nous avons montré que les cellules ciliées internes proviennent de la GER tandis que les cellules ciliées externes dérivent de la LER, prouvant que l'organe de Corti se développe à partir des progéniteurs à la fois de la GER et de la LER. Ces résultats sont en accord avec la présence de cellules immatures exprimant la nestine, localisées dans la GER, qui peuvent *in vitro*, donner naissance à de nouvelles cellules ciliées et cellules de soutien (Malgrange et al., 2002a).

## 2 La première cellule identifiable est la cellule pilier interne

Jusqu'ici, la connaissance du développement cellulaire de l'organe de Corti nous apprenait que la cellule ciliée interne était la première cellule à se différencier dans l'organe de Corti, vers E16 chez la souris et E18 chez le rat (Anniko, 1983;Romand et al., 1993;Zine and Romand, 1996). Or, dans le présent travail, nous montrons que c'est la cellule pilier interne qui est la première cellule de l'organe de Corti individualisable. Cette cellule se localise toujours à la frontière entre la GER et la LER. Elle se distingue des autres cellules de l'épithélium du canal cochléaire par sa position dès E17 en coupes semi-fines et dès E16 en microscopie électronique, grâce aux polysaccharides cytoplasmiques qu'elle contient, caractéristiques des cellules piliers (Hilding et al., 1977;Prieto et al., 1995), dont la nature et la fonction sont inconnus à ce jour. Des études antérieures sur la cellule pilier suggéraient que ces polysaccharides pourraient être du glycogène (Hilding et al., 1977;Prieto et al., 1995). Pouvant dès lors constituer les réserves énergétique de cette cellule lors du développement, nos travaux en cours suggèrent toutefois qu'il pourrait s'agir également d'une accumulation de résidus constitutifs des glycosaminoglycans. Ceci nous laisse imaginer que la cellule pilier interne pourrait être impliquée dans la synthèse des protéoglycans constitutifs de la membrane tectoriale (Tsuprun and Santi, 1997).

### 3 Voie de signalisation Notch

Lors de ce travail, nous montrons que la cellule pilier interne se développe avant les cellules ciliées. Or, la connaissance actuelle des mécanismes régulant le développement de l'organe de Corti nous apprend que la différenciation des cellules de soutien dépend de signaux produits par les cellules ciliées, notamment de l'inhibition latérale médiée par la voie de signalisation Notch (Kiernan et al., 2005; Takebayashi et al., 2007; Woods et al., 2004). L'observation de l'histologie de l'organe de Corti permet de constater que la région des cellules piliers et des cellules phalangéaires est unique dans la mesure où l'on ne retrouve pas la rigoureuse alternance cellule ciliée - cellule de soutien observée dans tout le reste de l'organe de Corti. Réalisant la zone de transition cellule ciliée interne - cellule ciliée externe, les cellules piliers interne et externe, la cellule phalangéaire interne, trois cellules de soutien, sont adjacentes. Au cours de ce travail, nous avons montré que Notch 1 activé est présent dans toutes les cellules de soutien de l'organe de Corti à l'exclusion des cellules piliers internes, suggérant une singularité des mécanismes de régulation du développement de cette cellule. Cette observation concorde avec le phénotype des souris invalidées pour différents effecteurs du système Notch, où la différenciation de la cellule pilier interne n'est jamais altérée (Kiernan et al., 2005; Takebayashi et al., 2007; Woods et al., 2004). En accord avec nos observations, *lunatic fringe* (Lnf), modulateur extracellulaire de Notch, est exprimé par toutes les cellules de soutien sauf la cellule pilier interne (Zhang et al., 2000). Par ailleurs, l'invalidation du récepteur au FGF de type 3 (FGFR3) induit la disparition de la cellule pilier interne (Colvin et al., 1996) et une augmentation du nombre de cellules ciliées externes et de cellules de Deiters correspondantes (Hayashi et al., 2007). Récemment, il a été précisé que chez ces souris *Fgfr3*<sup>-/-</sup>, les cellules piliers externes sont toujours présentes mais indifférenciées, tandis que les cellules ciliées internes disparaissent. L'absence de cellules piliers internes dans les cochlées *Fgfr3*<sup>-/-</sup> suggère que la signalisation du récepteur au FGF de type 3 joue un rôle dans la détermination du destin de cette cellule. Cette hypothèse est confortée par la constatation d'une augmentation du nombre de cellules ciliées externes et de cellules de Deiters dans l'organe de Corti des souris *Fgfr3*<sup>-/-</sup> sans accroissement de la prolifération cellulaire laissant penser que les cellules qui auraient dû devenir des cellules piliers internes ont changé de destin cellulaire (Puligilla et al., 2007). En accord avec cette hypothèse, la délétion de *Sprouty2*, régulateur négatif de la voie de signalisation des FGFs, conduit la production de trois cellules piliers et ce, au détriment du nombre de cellules de Deiters (Shim et al., 2005). Bien qu'il soit établi que les cellules ciliées modulent le destin et la différenciation des cellules adjacentes (Kiernan et al., 2005; Lanford et al., 1999; Woods et al., 2004), il semblerait dès lors possible que la présence de la cellule pilier interne soit également indispensable à la différenciation des autres types cellulaires de l'organe de Corti, suggérant que les cellules ciliées ne sont peut-être pas les seules inductrices de la différenciation cellulaire au sein de l'organe de Corti (Kelley, 2006).

## Conclusion

La cellule pilier interne semble jouer un rôle central dans le développement de l'organe de Corti. Elle constitue la première cellule identifiable de cet organe et son développement semble indépendant de la voie Notch. Ceci ouvre de nouvelles perspectives dans les voies de signalisation qui régulent le développement de l'organe sensoriel de l'audition. Les cellules ciliées ne seraient plus les seules coordinatrices du destin cellulaire de l'organe de Corti, la cellule pilier interne pourrait, elle aussi, être impliquée dans la régulation du destin des cellules de l'épithélium sensoriel. Dès lors, bien qu'encore largement inconnus, les facteurs moléculaires qui régulent le développement de la cellule pilier interne nous semblent une voie de recherche intéressante dans le cadre de l'étude des mécanismes qui sous-tendent la régénération et la différenciation des cellules de la cochlée des mammifères.

## Introduction

Alors que l'ambition du travail exposé dans la première partie est de mieux comprendre le développement cochléaire et la différenciation cellulaire de l'organe de Corti, l'objectif de cette deuxième partie consiste en l'analyse du développement des cellules du ganglion spiral, mais aussi de la régénération des cellules nerveuses après un traumatisme. L'importance de la compréhension des mécanismes qui régissent le développement ou qui aboutissent à la mort des neurones auditifs est évidente dans le contexte plus général de la compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent les surdités neurosensorielles. Dans cette partie de notre travail, nous avons spécifiquement étudié le rôle du facteur de transcription Sox10 au cours du développement de l'oreille interne chez les souris invalidées pour ce gène, en continuité de la première partie de notre travail.

## Résultats

### 1 Expression de Sox10 dans le ganglion spiral

#### 1.1 Révélation de l'activité $\beta$ -galactosidase

Grâce à la révélation de l'activité enzymatique de la  $\beta$ -galactosidase chez les souris Sox10<sup>lacZ/+</sup>, nous avons étudié la distribution tissulaire de Sox10 dans le ganglion spiral. Sur coupes histologiques, nous avons constaté que Sox10 est présent dans toutes les cellules de la placode otique (cf. 1<sup>er</sup> partie) et que certaines cellules du ganglion cochléo-vestibulaire puis du ganglion spiral l'expriment également. Dans l'oreille interne adulte, Sox10 reste présent dans certaines cellules du ganglion spiral.

#### 1.2 Caractérisation immunologique

Comme déjà mentionné précédemment, à l'échelle cellulaire, la révélation de l'activité  $\beta$ -galactosidase nous permet de montrer que Sox10 est exprimé dans de nombreux types cellulaires de la cochlée, à la fois dans l'organe de Corti, le ganglion spiral et la strie vasculaire. Au sein du ganglion spiral, nous avons caractérisé le phénotype des cellules exprimant Sox10 par double immuno-marquage en fluorescence avec respectivement des marqueurs de cellules de Schwann ou des marqueurs neuronaux, et un anticorps anti- $\beta$ -galactosidase dans des coupes de cochlées de souris Sox10<sup>lacZ/+</sup> de différents âges. L'histologie du ganglion cochléo-vestibulaire nous apprend que celui-ci est exclusivement composé de deux types cellulaires qui possèdent une origine embryologique différente ; d'une part les neurones ou cellules ganglionnaires, qui dérivent de la portion ventrale de la placode otique dès le développement précoce de celle-ci et d'autre part les cellules gliales, cellules de Schwann myélinisantes ou non, qui proviennent de la migration et de la différenciation de certaines cellules des crêtes neurales. Les doubles immuno-marquages  $\beta$ -galactosidase/ $\beta$ III-tubuline, protéine constitutive des microtubules du cytosquelette des neurones, ont permis de montrer que les neurones auditifs n'expriment pas Sox10

puisque nous n'avons jamais observé de colocalisation de ces deux anticorps. Sox10 devait dès lors être exprimé par la seconde population cellulaire du ganglion, à savoir, les cellules de Schwann. Afin de marquer ces cellules gliales, nous avons utilisé différents anticorps spécifiquement dirigés contre des protéines présentes dans les cellules de Schwann, tels que la protéine gliale fibrillaire acide (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP), p75<sup>NTR</sup> (récepteur des neurotrophines de faible affinité), Oct6 et S100 (Jessen et al., 1990; Kawasaki et al., 2003; Matheny et al., 1992; Neuberger and Cornbrooks, 1989). Cependant, aux stades embryonnaires étudiés, les cellules gliales du ganglion spiral ne synthétisent pas encore de myéline. Elles n'ont donc jamais pu être mises en évidence par ces anticorps qui marquent les cellules de Schwann myélinisantes du système nerveux périphérique. Pour outre passer ce problème technique, nous avons eu recours à l'anticorps anti-nestine. Protéine des filaments intermédiaires, la nestine est exprimée par les cellules immatures du système nerveux central et périphérique (Lendahl et al., 1990). Au sein du ganglion spiral, nous avons dès lors identifié une population de cellules, nestine-positives,  $\beta$ III-tubuline-négatives et  $\beta$ -galactosidase-positives. Ces expériences nous ont permis de conclure que Sox10 est exclusivement présent dans les cellules de Schwann. Sachant que les cellules gliales du ganglion spiral dérivent des cellules des crêtes neurales, il était logique de constater que ce sont les cellules de Schwann du ganglion spiral qui expriment ce facteur de transcription.

## 2 Développement du ganglion spiral en l'absence de Sox10

Une fois le profil d'expression développemental de Sox10 définit dans le ganglion spiral grâce aux souris Sox10<sup>lacZ/+</sup>, nous avons entrepris d'étudier la morphologie et le développement du système nerveux cochléaire en son absence chez les souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>. Pour rappel, suite à des troubles du fonctionnement du système nerveux autonome, la mutation du gène Sox10 à l'état homozygote est létale, rendant impossible l'examen d'animaux Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup> au-delà de la naissance.

### 2.1 Histologie du ganglion spiral

La révélation de l'activité  $\beta$ -galactosidase chez les animaux Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup> à E13.5 et E17.5, nous a permis de constater que Sox10 était présent dans l'épithélium du canal cochléaire, mais complètement absent du ganglion spiral. Ces résultats suggèrent que les cellules gliales du ganglion spiral, cellules exprimant Sox10 chez les animaux Sox10<sup>lacZ/+</sup> et dérivant des crêtes neurales sont absentes chez les souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons utilisé l'anticorps anti-nestine et contrairement au ganglion spiral des souris Sox10<sup>lacZ/+</sup>, nous n'avons pas pu détecter la présence de cellules nestine-positives au sein du ganglion des animaux Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup> tandis que les cellules nestine-positives du mésenchyme périotique étaient bien présentes. Toujours en immunofluorescence, nous avons alors réalisé des marquages  $\beta$ III-tubuline afin d'identifier le contingent neuronal du ganglion spiral. Malgré l'absence de Sox10 et de cellules nestine-positives chez les animaux Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>, les

neurones auditifs sont toujours bien présents jusqu'au stade embryonnaire tardif étudié, c'est-à-dire E17.5.

Parce que l'absence d'une protéine en immunofluorescence et l'absence de révélation d'activité enzymatique n'étaient pas suffisantes pour affirmer l'absence d'un type cellulaire, nous avons réalisé une étude histologique détaillée des animaux invalidés pour Sox10 en coupes semi-fines et en microscopie électronique à transmission. Ces deux techniques ont non seulement permis de confirmer l'absence de cellules gliales du ganglion spiral chez les souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>, soulignant le caractère dépendant de ces cellules à ce facteur de transcription, mais ont surtout permis d'observer des neurones auditifs de structure et de morphologie parfaitement normales malgré l'absence de cellules gliales. Au sein du ganglion spiral des souris Sox10<sup>lacZ/+</sup> et sauvages, les neurones auditifs se trouvent dans un environnement protégé par une palissade créée par les cellules gliales. Ces dernières envoient leurs prolongements cytoplasmiques autour des neurones, en bordure du ganglion et réalisent une véritable isolation protectrice des neurones par rapport au mésenchyme adjacent. Observés en microscopie électronique, les neurones auditifs apparaissent comme des cellules à volumineux noyau circulaire, contenant un ou plusieurs nucléoles bien développés et au cytoplasme riche en organites. De leur côté, les cellules gliales apparaissent comme des cellules polymorphes, plus petites, plus sombres, à chromatine condensée et possédant de nombreuses et longues extensions cytoplasmiques qui leur permettent d'entourer les cellules ganglionnaires. Chez les souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>, ces cellules gliales ne sont pas retrouvées. Les neurones ne sont dès lors pas isolés du tissu conjonctif adjacent. Néanmoins, ils sont regroupés entre eux et on peut distinguer entre ces cellules, de nombreux vaisseaux capillaires, des fibrocytes mais aussi certaines cellules inflammatoires. Par contre, malgré l'absence de cellules gliales, au contraire des ganglions rachidiens (Sonnenberg-Riethmacher et al., 2001), les neurones auditifs présentent une structure et une morphologie parfaitement conservées. Aucun signe microscopique de souffrance cellulaire, nécrose, condensation de la chromatine, vacuolisation des organelles ou encore altération des membranes cellulaires ne peuvent être observés. Au contraire, les cellules ganglionnaires, riches en organites, possèdent toujours des nucléoles bien développés, signe d'une activité cellulaire robuste.

## 2.2 *Survie neuronale*

Les cellules gliales sont connues dans le système nerveux pour être non seulement essentielles en tant que support et soutien pour les neurones, mais aussi pour assurer la création d'un microenvironnement propice à l'épanouissement de ces derniers. Elles participent ainsi à l'homéostasie du milieu neuronal (Davies, 1998b). Dans le ganglion spiral des souris invalidées pour le gène Sox10, et plus particulièrement dans celui des souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup> où les cellules gliales sont absentes, nous avons évalué la survie neuronale et recensé la mort neuronale par apoptose. Nous avons remarqué que la

densité neuronale aux âges embryonnaires E13.5 et E17.5 chez les animaux des trois génotypes était tout a fait conservée et identique. Confirmation que non seulement les neurones auditifs sont présents en l'absence de Sox10 et de cellules gliales, mais qu'en plus d'avoir une morphologie normale, leur densité n'est pas altérée. Par ailleurs, des expériences de mise en évidence de mort cellulaire par apoptose par la méthode TUNEL (*Terminal transferase dUTP nick end labeling*), aux mêmes âges, ont montré que la mort cellulaire dans le ganglion spiral n'était pas accrue chez les animaux Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>. Au contraire, au stade embryonnaire E17.5, le nombre de cellules TUNEL-positives est significativement diminué dans le ganglion spiral des souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>. A l'opposé de la situation observée dans les autres ganglions périphériques des souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>, l'absence de cellules gliales n'est pas délétère au développement et à la survie des neurones auditifs embryonnaires.

Sachant que le développement et la survie des neurones auditifs sont dépendants des neurotrophines produites par les cellules de l'organe de Corti (Fritsch and Beisel, 1998; Pirvola et al., 1994), et que celles-ci agissent par l'intermédiaire des récepteurs Trk, nous avons également réalisé des immunomarquages en fluorescence à l'aide d'anticorps dirigés spécifiquement contre ces récepteurs. Ces expériences montrent que ceux-ci sont bien exprimés dans les neurones du ganglion spiral des animaux des trois génotypes sans expression différentielle. Qui plus est, il a été montré que les neurotrophines sont produites par les cellules ciliées, qui elles, sont parfaitement développées en l'absence de Sox10 comme nous l'avons décrit dans la première partie de ce travail.

Par ailleurs, par hybridation *in situ*, nous avons mis en évidence l'expression d'ErbB3, cible connue de Sox10 (Britsch et al., 2001), dans les cellules gliales du ganglion spiral à E17.5. Ce récepteur des neurégulines (revu dans Britsch, 2007), est complètement absent du ganglion spiral des souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>, son expression est réduite dans le ganglion des souris Sox10<sup>lacZ/+</sup>, tandis qu'on détecte nettement sa présence dans le ganglion spiral des souris sauvages.

## Discussion

Il est classiquement établi que les cellules gliales sont essentielles au développement neuronal. La neuritogenèse, mais aussi les phénomènes de régénération neuronale nécessitent des interactions dynamiques entre les neurones et les cellules gliales (Davies, 1998a; Davies, 1998b; Morris et al., 1999; Riethmacher et al., 1997; Wolpowitz et al., 2000). En échange, la prolifération des cellules de Schwann, leur différenciation et la myélinisation dépendent de leurs interactions avec les neurones (Mirsky and Jessen, 1996; Mirsky et al., 1996). Dans ce contexte, étonnamment, dans l'oreille interne des souris  $Sox10^{lacZ/lacZ}$ , l'absence de cellules gliales ne conduit pas à un accroissement de la mort neuronale. A la différence des autres ganglions nerveux périphériques, dont les neurones et les cellules gliales possèdent la même origine embryologique (Le Douarin, 1984), le ganglion spiral présente la particularité d'être composé d'une population cellulaire à double origine embryonnaire (D'Amico-Martel and Noden, 1983; Le Douarin, 1984). Les neurones auditifs d'une part, proviennent de la différenciation des neuroblastes de la portion ventrale de la vésicule otique, et d'autre part, les cellules gliales, cellules de Schwann, dérivent des cellules des crêtes neurales. En l'absence de Sox10, une réduction majeure du pool de cellules multipotentes dérivées des crêtes neurales est observée. Sox10 est nécessaire à la survie et au développement des mélanocytes et des cellules gliales du système nerveux périphérique, cellules toutes dérivant des cellules des crêtes neurales (Bondurand et al., 2006; Herbarth et al., 1998; Kapur, 1999; Southard-Smith et al., 1998). De plus, dans la majorité des ganglions périphériques, dont les ganglions rachidiens, l'absence d'expression de Sox10 conduit à une perte progressive des neurones, qu'elle soit liée à la perte de Sox10 elle-même et à ses conséquences sur toutes les cellules dérivées des crêtes neurales (Kim et al., 2003), ou bien à la perte des facteurs neurotrophiques d'origine gliale (Britsch et al., 2001). Cette mort neuronale est constatée très tôt, dès l'âge embryonnaire de E11.5, lors du développement des ganglions rachidiens de la souris  $Sox10^{lacZ/lacZ}$  (Britsch et al., 2001; Paratore et al., 2001; Sonnenberg-Riethmacher et al., 2001), alors que, jusqu'à E17.5, dans le ganglion spiral de ces souris, nous n'observons pas de mort cellulaire accrue. Chez le poisson zèbre, une absence de différenciation gliale est également observée et tenue pour responsable de la perte des neurones des ganglions rachidiens (Dutton et al., 2001; Kelsh and Raible, 2002). Cependant, chez cet animal, Sox10 pourrait aussi avoir un effet direct sur ces neurones (Carney et al., 2006). Sox10 jouerait donc un rôle dans la spécification de toutes les cellules des ganglions rachidiens, mais qui plus est, il existerait une différence de sensibilité des neurones aux facteurs trophiques apportés par les cellules gliales selon les espèces, voire même selon la population neuronale étudiée comme le montre nos expériences dans le ganglion spiral.

Une absence de cellules de Schwann dans le ganglion spiral a également été identifiée dans un autre modèle de souris transgéniques. Chez la souris  $ErbB2^{-/-}$ , le ganglion spiral se trouve en position anormale, suggérant que l'absence de cellules gliales conduit à la migration aberrante des neurones à



partir de la vésicule otique (Morris et al., 2006), ce que nous n'avons pas constaté chez les souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>. De plus, contrairement aux résultats observés suite à l'inactivation de Sox10, l'analyse de l'ultrastructure du ganglion spiral des souris *ErbB2*<sup>-/-</sup> montre de nombreuses cellules en apoptose (Morris et al., 2006). Ainsi, l'absence des cellules gliales dans les souris invalidées pour *ErbB2* n'a pas la même conséquence que celle observée en l'absence de Sox10.

Dans l'oreille interne des souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>, nous avons donc observé que l'absence de cellules gliales ne conduit pas à un accroissement de la mort neuronale. Or, il est connu que dans l'oreille interne, la survie neuronale et la maintenance synaptique sont largement dépendantes des facteurs trophiques tels que les neurotrophines (Davies and Wright, 1995), produites par différentes sources. Molécules paracrines, produites par les cellules ciliées (Fritsch et al., 1997a), elles peuvent également agir selon un mode autocrine, via une synthèse propre par les neurones auditifs (Hansen et al., 2001b; Wiechers et al., 1999; Zha et al., 2001). De plus, les cellules gliales constituent également une source exogène de neurotrophines pour les neurones cochléaires (revu dans Davies, 1998b). Ainsi, il est possible que les neurones du ganglion spiral montrent une sensibilité réduite aux facteurs trophiques produits par les cellules gliales. Leur origine embryonnaire placodale peut être une explication à ce phénomène, mais c'est surtout la connaissance du rôle des cibles périphériques, les cellules ciliées, et centrales, les noyaux cochléo-vestibulaires du tronc cérébral, dans l'apport des facteurs trophiques des neurones de l'oreille interne (Ernfors et al., 1992), qui nous permet de suggérer que le développement des neurones auditifs pourrait être indépendant des cellules gliales, lorsque l'apport en facteurs trophiques par les cibles centrales et périphériques est maintenu, comme c'est le cas chez la souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>.

Une autre possibilité pour expliquer l'absence de mort neuronale en l'absence de cellules gliales serait qu'il existe une redistribution des facteurs trophiques ou une uprégulation génique dans les neurones cochléaires, leur assurant une protection contre la mort cellulaire. Des gènes constitutivement impliqués dans le développement des neurones auditifs tels que *Ngn1* ou *NeuroD* par exemple (Liu et al., 2000; Ma et al., 2000), pourraient être réactivés afin de maintenir et stabiliser le développement des neurones du ganglion spiral. De la même façon, des facteurs non constitutifs pourraient être activés dans les neurones du ganglion spiral, permettant *in fine*, de suppléer au manque de cellules gliales et de leur apport trophique. TrkA par exemple, récepteur des neurotrophines et plus particulièrement du NGF (Crowley et al., 1994; Wright and Snider, 1995), classiquement exprimé dans les neurones des ganglions rachidiens mais pas dans les neurones auditifs durant la vie embryonnaire (Carroll et al., 1992; Dai et al., 2004; White et al., 1996), pourrait être un de ces candidats.

Si chez les animaux Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>, nous montrons que malgré l'absence de cellules gliales, la survie des neurones du ganglion cochléo-vestibulaire n'est pas affectée, il est indispensable de modérer cette affirmation. Dans la première partie de ce travail, nous avons montré qu'il existe un raccourcissement de la cochlée des souris invalidées pour le gène Sox10. Dès lors, il est plausible que malgré une densité

conservée, le nombre total de neurones cochléaires soit réduit chez les souris Sox10<sup>lacZ/lacZ</sup>. En corollaire, en plus de jouer un rôle essentiel dans l'établissement du pool des progéniteurs cellulaires du canal cochléaire, Sox10 pourrait être également impliqué dans l'établissement du pool des neuroblastes qui s'individualisent de la placode otique. Afin de vérifier cette hypothèse, nous projetons de quantifier la mort cellulaire non plus à E12.5, comme nous l'avons fait dans l'épithélium cochléaire, mais à E9.5, moment de l'individualisation des neuroblastes (D'Amico-Martel and Noden, 1983).

Par ailleurs, le caractère létal de la mutation de Sox10 à l'état homozygote nous empêche malheureusement d'étudier le devenir et le fonctionnement de ces neurones dans un organisme mature. A l'avenir, l'existence de mutant conditionnel (Li et al., 2004; Tian et al., 2006), ou l'inactivation ciblée de Sox10 par des SiARN pourraient nous permettre d'étudier son rôle dans la survie à long terme des cellules du ganglion spiral (Roh et al., 2006).

## Conclusion

En conclusion, nous avons montré que dans le ganglion spiral, en l'absence de Sox10, les cellules dérivées des crêtes neurales, les cellules de Schwann étaient absentes, soulignant le caractère dépendant de ces cellules au gène Sox10. Au niveau du ganglion spiral, nous avons montré que contrairement aux neurones des ganglions rachidiens (Sonnenberg-Riethmacher et al., 2001), le développement et la survie embryonnaires des neurones auditifs étaient indépendants des cellules gliales et de Sox10. Cette observation peut être notamment expliquée par l'origine embryologique différente des neurones auditifs et des neurones des ganglions rachidiens, les premiers dérivant de la placode otique et les seconds des crêtes neurales, il est plausible d'assumer qu'en l'absence de Sox10, les mêmes répercussions sur le devenir de ces deux types de cellules ne soient pas observées. Qui plus est, il a été montré que la survie des neurones auditifs était dépendante des neurotrophines produites par les cellules ciliées, qui elles, sont parfaitement développées en l'absence de Sox10. Ainsi, l'absence de Sox10 ne porte pas à conséquence sur le développement embryonnaire et la survie de neurones auditifs, mais sa présence est essentielle au développement des cellules de Schwann dérivées des crêtes neurales.

L'indépendance des neurones par rapport aux cellules de Schwann nous semble un des messages essentiels de cette partie de notre travail. Phénomène inconcevable ailleurs dans le système nerveux périphérique, l'organisation du système nerveux cochléaire semble posséder des propriétés singulières pouvant nous intéresser dans la mise au point de stratégies régénératrices et protectrices des neurones cochléaires.

## Introduction

De nombreuses pathologies auditives sont imputées à une absence d'intégrité des neurones du ganglion spiral. La connaissance des mécanismes intracellulaires impliqués dans la mort de ces neurones est un pré-requis essentiel à toute perspective thérapeutique. Lors de notre travail, nous avons développé un modèle *in vitro* de dégénérescence des neurones du ganglion spiral qui se rapproche le plus possible de la situation observée *in vivo*. Nous avons mis en évidence, dans ce modèle, le rôle de la périphérine, protéine des filaments intermédiaires exprimée lors du développement embryonnaire et réactivée dans les neurones auditifs matures après lésion axonale. Pour rappel, il existe deux types de neurones cochléaires : les neurones de type I, connectés aux cellules ciliées internes, et les neurones de type II, connectés aux cellules ciliées externes. Les neurones de type I sont des cellules à soma volumineux, myélinisées, au cytoplasme riche en organites, et représentent 90 à 95% de l'ensemble des neurones du ganglion spiral tandis que les neurones de type II, qui constituent le reste de la population neuronale du ganglion spiral, sont plus petits et ne sont pas myélinisés. A ce jour, la périphérine était exclusivement utilisée dans l'oreille interne en tant que marqueur spécifique des neurones de type II (Hafidi, 1998). Cette protéine, connue pour être exprimée dans les motoneurones et dans certains neurones dérivés des crêtes neurales et des placodes (Ecurat et al., 1990; Gorham et al., 1990; Parysek et al., 1988; Troy et al., 1990), est également exprimée lors de la croissance axonale et dans les fibres nerveuses de petit calibre des petits neurones des ganglions rachidiens et des ganglions sympathiques (Brody et al., 1989; Rhrich-Haddout et al., 1997). Elle serait impliquée dans les phénomènes de croissance nerveuse lors du développement ainsi que dans la régénération axonale après traumatisme nerveux (Oblinger et al., 1989b; Oblinger et al., 1989a; Terao et al., 2000). Des études réalisées *in vitro*, ont montré la possibilité d'induction de son expression par l'adjonction de facteurs trophiques (Lecomte et al., 1998; Thompson and Ziff, 1989) ainsi qu'une réduction de la capacité d'extension neuritique en cas de suppression de son expression (Helfand et al., 2003). Ces différentes données, nous ont amenés à penser que la périphérine pourrait posséder un rôle important lors des processus régénératifs neuronaux. Lors de ce travail, nous avons mis en évidence l'expression de la périphérine au cours du développement embryonnaire des neurones auditifs, mais surtout, nous avons montré que l'expression de la périphérine était réactivée dans les neurones de type I après lésion axonale et que cette réexpression était indépendante des cibles périphériques et de la voie de signalisation des neurotrophines provenant de l'organe de Corti.

## Résultats

### 1 **Analyse de l'expression de la périphérine dans les neurones cochléaires *in situ***

Préliminaire à l'analyse de l'expression de la périphérine dans les neurones déafférentés, nous avons tout d'abord caractérisé l'expression de cette protéine lors du développement embryonnaire tardif et post-natal précoce. En immunohistofluorescence, nous avons mis en évidence pour la première fois que tous les neurones du ganglion spiral expriment la périphérine au cours du développement tardif chez le rat (E19-P0). Après la naissance, la périphérine se localise exclusivement au niveau des neurones de type II où elle devient très intense. A partir de P10, l'expression de la  $\beta$ III-tubuline, ubiquitaire dans tous les neurones du ganglion spiral, est réduite dans les neurones de type II, périphérine-positifs. Ces constatations ont été confirmées par Western-Blot qui montrent une réduction de l'expression de la périphérine d'un facteur 9 entre la période embryonnaire tardive (E19) et l'âge post-natal P3.

### 2 **Mise au point d'un modèle de culture organotypique de neurones de ganglion spiral déafférentés**

Pour nous rapprocher le plus possible de la situation *in vivo* dans laquelle il existe une axotomie des neurones du ganglion spiral suite à un traumatisme sonore ou un traitement excitotoxique (d'Aldin et al., 1997; Miller et al., 2007; Puel et al., 1998), nous avons mis au point un modèle de dégénérescence des neurones du ganglion spiral en explants, suite à une déprivation en facteurs trophiques. La quantification de la survie neuronale a été réalisée par comptage des cellules marquées par la  $\beta$ III-tubuline, destinée à mettre en évidence le contingent neuronal de nos cultures.

Dans ce modèle de culture en explants, en l'absence des facteurs trophiques fournis par les cibles centrales et périphériques des cellules ganglionnaires, le nombre de neurones vivants diminue significativement à partir de 12 heures de culture par rapport au nombre de neurones présents au moment de la mise en culture. Cette réduction est associée à l'apparition de neurones possédant un marquage nucléaire fragmenté et très dense ainsi qu'à une diminution du volume cytoplasmique, tels qu'on peut l'observer lors de la mort cellulaire par apoptose (Lallemend et al., 2003). Après 24 heures de culture, toujours en "conditions d'axotomie bilatérale", très peu de neurones survivent. Approximativement 85 à 90% des neurones meurent suite à une dégénérescence cellulaire rétrograde secondaire aux lésions axonales et à la privation de facteurs trophiques. Si l'on modifie ces conditions expérimentales, en mettant en culture des ganglions spiraux séparés de leur cible centrale, mais restant associés à leur organe de Corti, leur cible périphérique, après 24 heures de culture, en l'absence de facteurs trophiques exogènes, on assiste à une réduction de plus de 40% de la population neuronale initiale.

Pour déterminer si la mort des neurones du ganglion spiral en culture organotypique était de nature apoptotique, nous avons traité des cultures de ganglions spiraux séparés de leur organe de Corti respectivement avec du BOC-D-FMK et avec des neurotrophines. Après 24 heures de culture, l'apport de BOC-D-FMK, un inhibiteur de pan-caspases, protéines essentielles au déroulement de l'apoptose, augmente significativement le nombre de neurones vivants dans les cultures d'explants de ganglion spiral par rapport au groupe contrôle. De la même façon, l'ajout de neurotrophines telles que NT-3 et BDNF au milieu de culture améliore la survie neuronale. Ces expériences préliminaires confirment à la fois que les neurones cochléaires sont dépendants de leurs cibles centrale et périphérique et qu'en l'absence de leurs facteurs trophiques, la dégénérescence neuronale est de nature apoptotique.

### **3 Expression de la périphérine *in vitro***

Afin de déterminer l'expression de la périphérine dans notre modèle de culture *in vitro*, nous avons tout d'abord étudié l'expression de cette protéine à différents âges post-nataux sur explants de ganglion spiral. Nous avons constaté que de P0 à P4, l'expression de la périphérine *in vitro* était identique à celle observée *in vivo*. Présente dans toute la population neuronale à P0, la périphérine se restreint à une faible proportion, environ 10%, des neurones à P4, ce qui correspond à la population estimée des neurones de type II.

### **4 Expression de la périphérine suite à une déafférentation neuronale**

Disposant d'un modèle *in vitro* possédant les caractéristiques quantitatives et qualitatives du *vivo*, nous avons étudié les variations d'expression de la périphérine dans notre population neuronale déafférentée. Dans notre modèle de culture de neurones en explants totalement déafférentés, après 24 heures de culture, malgré une diminution drastique de la population neuronale, nous avons constaté que les deux tiers des neurones survivants exprimaient la périphérine. Deux hypothèses étaient dès lors plausibles. Soit notre modèle de dégénérescence sélectionnait spécifiquement les neurones de type II, suggérant que les neurones de type I seraient plus sensibles aux lésions axonales (Lang et al., 2005; Leake and Hradek, 1988; Spöndlin, 1971), soit la périphérine était réexprimée dans une grande partie de la population neuronale du ganglion spiral.

En poursuivant notre caractérisation, nous avons remarqué qu'après axotomie unilatérale des neurones, c'est-à-dire en présence de l'organe de Corti, le nombre de neurones périphérine-positifs était également accru. Ne pouvant exclure un rôle des signaux trophiques, fournis par les cibles périphériques des neurones auditifs, nous avons analysé l'expression de la périphérine dans des neurones complètement axotomisés et mis en présence de BOC-D-FMK. Dans ces conditions, la survie neuronale est accrue et la population neuronale périphérine-positif est doublée. La périphérine est donc bien réexprimée dans les neurones de type I, et ce phénomène est bien indépendant des cibles des neurones.

## **5 Expression subcellulaire de la périphérine**

Afin d'étudier l'expression de la périphérine à l'échelle subcellulaire, nous avons mis en culture des neurones de ganglions spiraux dissociés. Dans ces neurones en régénération, nous avons observé que la grande majorité exprimait la périphérine en plus de la  $\beta$ III-tubuline. De plus, nous avons mis en évidence une distribution spécifique de la périphérine au niveau du cône de croissance alors que la  $\beta$ III-tubuline y était absente. Ces observations nous permettent de suggérer que la périphérine pourrait avoir un rôle structurel important au cours de l'élongation axonale.

## Discussion

La périphérine, protéine des filaments intermédiaires de type III, est exprimée de façon préférentielle, mais pas exclusive, par les neurones de petit calibre aux axones non myélinisés (Lariviere and Julien, 2004). Dans l'oreille interne des mammifères adultes, les neurones de type II répondent à ces caractéristiques (Raphael and Altschuler, 2003) et expriment spécifiquement la périphérine (Hafidi et al., 1993; Hafidi, 1998) alors que les neurones de type I ne l'expriment pas. Lors du développement embryonnaire, la neurogenèse otique se développe à partir d'un pool homogène de neuroblastes, pour former à la naissance, deux types cellulaires distincts en phénotype et en fonction, selon l'établissement de leurs connexions nerveuses : les neurones de type I et de type II. Au cours de ce travail, nous avons montré que la périphérine est une protéine largement exprimée lors du développement embryonnaire tardif (E19 chez le rat), et que celle-ci se restreint aux neurones de type II durant la période post-natale. Cette expression serait étroitement liée à la croissance axonale des neurones du ganglion spiral comme cela a déjà été démontré dans d'autres types de neurones (Angulo and Merchan, 1990; Lenoir and Pujol, 1980; Rubel and Fritsch, 2002). En effet, l'expression de la périphérine coïncide avec la croissance axonale et diminue après la naissance, une fois les connexions nerveuses établies. Grâce à ses propriétés visco-élastiques dynamiques et ses propriétés structurales (Helfand et al., 2003), la périphérine serait susceptible de faciliter la croissance axonale lors du développement de l'oreille interne. Une fois les contacts entre les projections nerveuses et leurs cibles établis, son expression ne serait plus nécessaire que dans les neurones de type II afin d'assurer un rôle de support et de soutien pour leurs fibres non-myélinisées (Brown, 1987; Fechner et al., 2001). En corollaire, dans les neurones de type I, l'extinction de l'expression de la périphérine coïncide avec l'initiation de l'expression des marqueurs de la myéline (Knipper et al., 1998).

Dans notre modèle d'axotomie *in vitro*, nous avons montré que l'augmentation de la population de neurones périphérine-positifs est liée à la réexpression de la périphérine dans les neurones de type I. Cette constatation a également été faite récemment *in vivo* après dénervation périphérique du ganglion spiral (Wang et al., 2006b). Nos résultats concordent avec l'idée que les mécanismes développementaux qui coordonnent le développement de l'oreille interne sont réactivés lors des processus de régénération (Ruel et al., 2007).



## Conclusion

Ce travail montre que la périphérine, connue pour être exprimée dans les neurones matures de type II (Hafidi, 1998), est exprimée par les neurones auditifs de type I et II lors du développement embryonnaire. La périphérine aurait un rôle stabilisateur de ces neurones cochléaires encore non-myélinisés. Par ailleurs, la périphérine serait impliquée dans les phénomènes de régénération axonale de la cochlée comme cela avait déjà été montré dans les ganglions rachidiens (Chadan et al., 1994;Oblinger et al., 1989b;Oblinger et al., 1989a;Terao et al., 2000;Willis et al., 2005). Ces expériences mettent en évidence un rôle vraisemblable de la périphérine dans les mécanismes de régénération post-traumatique, sous-tendant une fois de plus l'idée que des facteurs impliqués durant le développement embryonnaire sont réactivés lors de la mise en jeu des mécanismes de régénération tissulaire (Levic et al., 2007;Ruel et al., 2007). Dans une optique thérapeutique, assurer la survie neuronale et l'établissement des connexions des neurones aux cellules ciliées est un phénomène essentiel. De plus, on retiendra que le fonctionnement des implants cochléaires est directement dépendant du contingent neuronal viable dans la cochlée. Ainsi, comprendre la nature des signaux qui régulent la réponse des neurones aux lésions traumatiques nous paraît essentiel afin de permettre de stimuler la croissance et la régénération axonale en cas de lésion.

## Discussion générale

La compréhension fine du développement de l'oreille interne et des mécanismes qui le sous-tendent nous apparaît primordiale afin de mieux appréhender les phénomènes impliqués dans la régénération des cellules cochléaires, quelles soient ciliées ou neuronales. Dans ce travail, nous avons abordé deux pans essentiels au concept même d'audition et de restauration de la fonction auditive. En effet, le développement et la régénération des cellules ciliées d'une part, et des neurones auditifs, d'autre part, n'a de sens que si l'intégrité de ces deux compartiments cellulaires est conservée. La transduction du son, assurée par ces deux effecteurs cellulaires n'est possible que si les cellules ciliées et nerveuses sont présentes et intègres, et que ces cellules ciliées sont connectées à des neurones auditifs parfaitement fonctionnels.

Dans la première partie de ce travail, consacrée à l'étude du développement embryonnaire du canal cochléaire et de l'organe de Corti, nous montrons dans le chapitre concernant le facteur de transcription Sox10 que :

- Sox10 est exprimé très tôt lors du développement de l'oreille interne, mais qu'il n'influence pas l'induction ni le devenir de la placode otique.
- Lors du développement précoce, Sox10 est essentiel à l'établissement de la population des cellules progénitrices du canal cochléaire.
- Dans l'organe de Corti, lors de la différenciation cellulaire, Sox10 se restreint aux seules cellules de soutien, suggérant un rôle pour ce facteur de transcription, et d'une façon plus générale pour les gènes SoxE, dans la différenciation des cellules de l'épithélium sensoriel. De plus, à l'échelle cellulaire, nous avons également montré que Sox10 est nécessaire à la survie des cellules intermédiaires de la strie vasculaire, cellules dérivées des crêtes neurales

Dans la seconde partie de ce premier versant consacré au développement des cellules de l'organe de Corti, nous montrons également que :

- La première cellule de l'organe de Corti identifiable est la cellule pilier et que celle-ci trouve naissance dans la zone de jonction entre la GER et la LER.
- Le développement de cette cellule semble échapper au système d'inhibition latérale lié à Notch et pourrait avoir un rôle dans la différenciation des autres cellules de l'organe de Corti.

Dans le deuxième volet de ce travail, nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur la structure nerveuse de l'oreille interne, le ganglion spiral. Dans la partie consacrée au facteur de transcription Sox10, nous montrons que :

- Sox10 est nécessaire à la survie des cellules de Schwann du ganglion spiral, cellules dérivées des crêtes neurales.

- *A contrario* de la situation observée dans la majorité des ganglions périphériques, le développement et la survie des neurones auditifs sont indépendants des cellules gliales et de ce facteur de transcription durant l'embryogenèse. En effet, nous n'avons jamais observé d'accroissement de la mort neuronale dans le ganglion spiral en l'absence de Sox10.

D'autre part, toujours dans le deuxième volet de ce travail, nous nous sommes intéressés aux mécanismes cellulaires liés à la survie neuronale dans le ganglion spiral.

- Dans un premier temps, nous avons conçu un modèle d'explants de ganglions spiraux en culture qui nous a permis d'évaluer la mort neuronale lors des processus de déafférentation des neurones auditifs et qui se rapprochait le plus possible des conditions observées généralement *in vivo*.

- Ensuite, nous avons étudié l'expression de la périphérine, protéine des neurones de type II du ganglion spiral mature, lors du développement embryonnaire et dans notre modèle de culture organotypique. L'expression différentielle observée, nous a permis de conclure que la périphérine, exprimée par tous les neurones durant la période embryonnaire était réexprimée après lésion des neurones auditifs, suggérant une récapitulation des processus développementaux lors des phénomènes régénératifs.

En conclusion, aux lueurs de notre travail nous espérons avoir permis au lecteur une meilleure compréhension du développement complexe et raffiné de l'oreille interne, à la fois dans son versant sensoriel et neuronal. En effet, les surdités de perception, génétiques ou acquises, sont la conséquence d'une atteinte des divers constituants cellulaires de l'oreille interne. La mort des cellules ciliées et/ou des neurones auditifs en est d'ailleurs un des exemples les plus fréquents. Dès lors, remplacer les cellules ciliées disparues et rétablir les connexions nerveuses entre l'épithélium sensoriel régénéré et les noyaux cochléaires, sont les objectifs élémentaires de la restauration d'une audition physiologie. Nous basant sur un modèle animal de surdité neurosensorielle génétique syndromique, nous pensons avoir contribué à la découverte d'un gène qui régule le développement des progéniteurs du canal cochléaire. Ensuite, dans le cadre de la différenciation des progéniteurs du domaine prosensoriel, nous pensons avoir identifié la première cellule qui se différencie dans l'organe de Corti, la cellule pilier interne. Le versant neuronal n'est pas moins important. Stimuler la survie neuronale et la neuritogenèse des neurones du ganglion spiral vers l'épithélium sensoriel constitue un autre challenge dans la perspective de la régénération tissulaire cochléaire et de rétablissement de la fonction auditive. La notion d'indépendance des neurones auditifs vis-à-vis de leurs cellules voisines supposées trophiques, les cellules de Schwann ainsi que le modèle de culture développé dans notre laboratoire s'inscrivent dans cette optique de régénération et de maintien cellulaire des neurones auditifs.

Dans le cadre de la conception de stratégies visant à restaurer l'audition, nous ne pouvons terminer ce travail sans émettre une réserve aux notions développées ci-dessus. Pour chaque cas de régénération cellulaire, il conviendra ultérieurement de démontrer que la fonction initiale de ces cellules peut être restaurée. C'est seulement par des études électrophysiologiques *in vitro* et audiophysiologiques *in vivo* que nous serons capables d'ouvrir nos idées vers un concept thérapeutique plus large. Actuellement, les possibilités thérapeutiques sont limitées à des stratégies de suppléance de la fonction auditive, que ce soit par une prothèse auditive ou encore un implant cochléaire. Restaurer l'audition en comprenant les bases physiopathologiques des surdités constituerait une avancée immense dans les moyens mis en oeuvre pour celles et ceux qui vivent quotidiennement dans le monde du silence.

## Bibliographie

- Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C, Weil D, Cruaud C, Sahly I, Leibovici M, Bitner-Glindzicz M, Francis M, Lacombe D, Vigneron J, Charachon R, Boven K, Bedbeder P, Van Regemorter N, Weissenbach J, Petit C (1997) A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat Genet* 15:157-164.
- Abello G, Alsina B (2007) Establishment of a proneural field in the inner ear. *Int J Dev Biol* 51:483-493.
- Abello G, Khatri S, Giraldez F, Alsina B (2007) Early regionalization of the otic placode and its regulation by the Notch signaling pathway. *Mech Dev* 124:631-645.
- Acampora D, Avantaggiato V, Tuorto F, Briata P, Corte G, Simeone A (1998) Visceral endoderm-restricted translation of *Otx1* mediates recovery of *Otx2* requirements for specification of anterior neural plate and normal gastrulation. *Development* 125:5091-5104.
- Acampora D, Avantaggiato V, Tuorto F, Simeone A (1997) Genetic control of brain morphogenesis through *Otx* gene dosage requirement. *Development* 124:3639-3650.
- Acampora D, Mazan S, Avantaggiato V, Barone P, Tuorto F, Lallemand Y, Brulet P, Simeone A (1996) Epilepsy and brain abnormalities in mice lacking the *Otx1* gene. *Nat Genet* 14:218-222.
- Acampora D, Mazan S, Lallemand Y, Avantaggiato V, Maury M, Simeone A, Brulet P (1995) Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*<sup>-/-</sup> mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* 121:3279-3290.
- Acampora D, Merlo GR, Paleari L, Zerega B, Postiglione MP, Mantero S, Bober E, Barbieri O, Simeone A, Levi G (1999) Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the *Distal-less*-related gene *Dlx5*. *Development* 126:3795-3809.
- Adam J, Myat A, Le R, I, Eddison M, Henrique D, Ish-Horowicz D, Lewis J (1998) Cell fate choices and the expression of Notch, Delta and Serrate homologues in the chick inner ear: parallels with *Drosophila* sense-organ development. *Development* 125:4645-4654.
- Adamska M, Herbrand H, Adamski M, Kruger M, Braun T, Bober E (2001) FGFs control the patterning of the inner ear but are not able to induce the full ear program. *Mech Dev* 109:303-313.
- Akiyama H, Kamitani T, Yang X, Kandyil R, Bridgewater LC, Fellous M, Mori-Akiyama Y, de CB (2005) The transcription factor *Sox9* is degraded by the ubiquitin-proteasome system and stabilized by a mutation in a ubiquitin-target site. *Matrix Biol* 23:499-505.
- Alsina B, Giraldez F, Varela-Nieto I (2003) Growth factors and early development of otic neurons: interactions between intrinsic and extrinsic signals. *Curr Top Dev Biol* 57:177-206.
- Alvarez Y, Alonso MT, Vendrell V, Zelarayan LC, Chamero P, Theil T, Bosl MR, Kato S, Maconochie M, Riethmacher D, Schimmang T (2003) Requirements for FGF3 and FGF10 during inner ear formation. *Development* 130:6329-6338.
- Amiel J, Attie T, Jan D, Pelet A, Edery P, Bidaud C, Lacombe D, Tam P, Simeoni J, Flori E, Nihoul-Fekete C, Munnich A, Lyonnet S (1996) Heterozygous endothelin receptor B (EDNRB) mutations in isolated Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 5:355-357.
- Anagnostopoulos AV (2002) A compendium of mouse knockouts with inner ear defects. *Trends Genet* 18:499.
- Anderson DJ (1989) The neural crest cell lineage problem: neurogenesis? *Neuron* 3:1-12.
- Anderson DJ (1997) Cellular and molecular biology of neural crest cell lineage determination. *Trends Genet* 13:276-280.
- Ando M, Takeuchi S (1998) Postnatal vascular development in the lateral wall of the cochlear duct of gerbils: quantitative analysis by electron microscopy and confocal laser microscopy. *Hear Res* 123:148-156.
- Ando M, Takeuchi S (1999) Immunological identification of an inward rectifier K<sup>+</sup> channel (Kir4.1) in the intermediate cell (melanocyte) of the cochlear stria vascularis of gerbils and rats. *Cell Tissue Res* 298:179-183.
- Angulo A, Merchan J (1990) Prenatal development of the cochlear nerve in the albino rat. *J Hirnforsch* 31:13-23.
- Anniko M (1983) Cytodifferentiation of cochlear hair cells. *Am J Otolaryngol* 4:375-388.
- Aoki Y, Saint-Germain N, Gyda M, Magner-Fink E, Lee YH, Credidio C, Saint-Jeannet JP (2003) *Sox10* regulates the development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. *Dev Biol* 259:19-33.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284:770-776.
- Axelrod JD (2001) Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling. *Genes Dev* 15:1182-1187.

- Axelrod JD, Miller JR, Shulman JM, Moon RT, Perrimon N (1998) Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev* 12:2610-2622.
- Badner JA, Chakravarti A (1990) Waardenburg syndrome and Hirschsprung disease: evidence for pleiotropic effects of a single dominant gene. *Am J Med Genet* 35:100-104.
- Badner JA, Sieber WK, Garver KL, Chakravarti A (1990) A genetic study of Hirschsprung disease. *Am J Hum Genet* 46:568-580.
- Baker CV, Bronner-Fraser M (2001) Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev Biol* 232:1-61.
- Barrett GL (2000) The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 61:205-229.
- Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M (1994) Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 79:1277-1285.
- Begbie J, Ballivet M, Graham A (2002) Early steps in the production of sensory neurons by the neurogenic placodes. *Mol Cell Neurosci* 21:502-511.
- Ben-Yosef T, Belyantseva IA, Saunders TL, Hughes ED, Kawamoto K, Van Itallie CM, Beyer LA, Halsey K, Gardner DJ, Wilcox ER, Rasmussen J, Anderson JM, Dolan DF, Forge A, Raphael Y, Camper SA, Friedman TB (2003) Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet* 12:2049-2061.
- Bermingham NA, Hassan BA, Price SD, Vollrath MA, Ben Arie N, Eatock RA, Bellen HJ, Lysakowski A, Zoghbi HY (1999) Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 284:1837-1841.
- Bermingham NA, Hassan BA, Wang VY, Fernandez M, Banfi S, Bellen HJ, Fritsch B, Zoghbi HY (2001) Proprioceptor pathway development is dependent on Math1. *Neuron* 30:411-422.
- Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de CB (1999) Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22:85-89.
- Bianchi LM, Conover JC, Fritsch B, DeChiara T, Lindsay RM, Yancopoulos GD (1996) Degeneration of vestibular neurons in late embryogenesis of both heterozygous and homozygous BDNF null mutant mice. *Development* 122:1965-1973.
- Bibel M, Barde YA (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14:2919-2937.
- Bichler E, Spoendlin H, Rauegger H (1983) Degeneration of cochlear neurons after amikacin intoxication in the rat. *Arch Otorhinolaryngol* 237:201-208.
- Bissonnette JP, Fekete DM (1996) Standard atlas of the gross anatomy of the developing inner ear of the chicken. *J Comp Neurol* 368:620-630.
- Boettger T, Hubner CA, Maier H, Rust MB, Beck FX, Jentsch TJ (2002) Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter Kcc4. *Nature* 416:874-878.
- Boettger T, Rust MB, Maier H, Seidenbecher T, Schweizer M, Keating DJ, Faulhaber J, Ehmke H, Pfeffer C, Scheel O, Lemcke B, Horst J, Leuwer R, Pape HC, Volkl H, Hubner CA, Jentsch TJ (2003) Loss of K-Cl co-transporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. *EMBO J* 22:5422-5434.
- Bok J, Chang W, Wu DK (2007a) Patterning and morphogenesis of the vertebrate inner ear. *Int J Dev Biol* 51:521-533.
- Bok J, Dolson DK, Hill P, Ruther U, Epstein DJ, Wu DK (2007b) Opposing gradients of Gli repressor and activators mediate Shh signaling along the dorsoventral axis of the inner ear. *Development* 134:1713-1722.
- Bondurand N, Girard M, Pingault V, Lemort N, Dubourg O, Goossens M (2001) Human Connexin 32, a gap junction protein altered in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease, is directly regulated by the transcription factor SOX10. *Hum Mol Genet* 10:2783-2795.
- Bondurand N, Natarajan D, Barlow A, Thapar N, Pachnis V (2006) Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. *Development* 133:2075-2086.
- Bondurand N, Pingault V, Goerich DE, Lemort N, Sock E, Le CC, Wegner M, Goossens M (2000) Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum Mol Genet* 9:1907-1917.
- Bondurand N, Stot-Le MF, Stanchina L, Collot N, Baral V, Marlin S, ttie-Bitach T, Giurgea I, Skopinski L, Reardon W, Toutain A, Sarda P, Echaieb A, Lackmy-Port-Lis M, Touraine R, Amiel J, Goossens M, Pingault V (2007) Deletions at the SOX10 gene locus cause Waardenburg syndrome types 2 and 4. *Am J Hum Genet* 81:1169-1185.
- Bouillet P, Oulad-Abdelghani M, Ward SJ, Bronner S, Chambon P, Dolle P (1996) A new mouse member of the Wnt gene family, mWnt-8, is expressed during early embryogenesis and is ectopically induced by retinoic acid. *Mech Dev* 58:141-152.

- Bowles J, Schepers G, Koopman P (2000) Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol* 227:239-255.
- Britsch S (2007) The neuregulin-I/ErbB signaling system in development and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 190:1-65.
- Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rossner M, Nave KA, Birchmeier C, Wegner M (2001) The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev* 15:66-78.
- Brody BA, Ley CA, Parysek LM (1989) Selective distribution of the 57 kDa neural intermediate filament protein in the rat CNS. *J Neurosci* 9:2391-2401.
- Brooker R, Hozumi K, Lewis J (2006) Notch ligands with contrasting functions: Jagged1 and Delta1 in the mouse inner ear. *Development* 133:1277-1286.
- Brown MC (1987) Morphology of labeled efferent fibers in the guinea pig cochlea. *J Comp Neurol* 260:605-618.
- Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, de RY (1985) Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 227:194-196.
- Burton Q, Cole LK, Mulheisen M, Chang W, Wu DK (2004) The role of Pax2 in mouse inner ear development. *Dev Biol* 272:161-175.
- Cable J, Barkway C, Steel KP (1992) Characteristics of stria vascularis melanocytes of viable dominant spotting (Wv/Wv) mouse mutants. *Hear Res* 64:6-20.
- Cable J, Jackson IJ, Steel KP (1995) Mutations at the W locus affect survival of neural crest-derived melanocytes in the mouse. *Mech Dev* 50:139-150.
- Cadigan KM, Nusse R (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11:3286-3305.
- Camarero G, Leon Y, Gorospe I, De PF, Alsina B, Giraldez F, Varela-Nieto I (2003) Insulin-like growth factor 1 is required for survival of transit-amplifying neuroblasts and differentiation of otic neurons. *Dev Biol* 262:242-253.
- Carney TJ, Dutton KA, Greenhill E, fino-Machin M, Dufourcq P, Blader P, Kelsh RN (2006) A direct role for Sox10 in specification of neural crest-derived sensory neurons. *Development* 133:4619-4630.
- Carnicero E, Zelarayan LC, Ruttiger L, Knipper M, Alvarez Y, Alonso MT, Schimmang T (2004) Differential roles of fibroblast growth factor-2 during development and maintenance of auditory sensory epithelia. *J Neurosci Res* 77:787-797.
- Carpenter EM, Goddard JM, Chisaka O, Manley NR, Capecchi MR (1993) Loss of Hox-A1 (Hox-1.6) function results in the reorganization of the murine hindbrain. *Development* 118:1063-1075.
- Carroll SL, Silos-Santiago I, Frese SE, Ruit KG, Milbrandt J, Snider WD (1992) Dorsal root ganglion neurons expressing trk are selectively sensitive to NGF deprivation in utero. *Neuron* 9:779-788.
- Casaccia-Bonnel P, Gu C, Chao MV (1999) Neurotrophins in cell survival/death decisions. *Adv Exp Med Biol* 468:275-282.
- Casimiro MC, Knollmann BC, Ebert SN, Vary JC, Jr., Greene AE, Franz MR, Grinberg A, Huang SP, Pfeifer K (2001) Targeted disruption of the *Kcnq1* gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2526-2531.
- Chaboissier MC, Kobayashi A, Vidal VI, Lutzkendorf S, van de Kant HJ, Wegner M, de Rooij DG, Behringer RR, Schedl A (2004) Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 131:1891-1901.
- Chadan S, Le Gall JY, Di GL, Filliatreau G (1994) Axonal transport of type III intermediate filament protein peripherin in intact and regenerating motor axons of the rat sciatic nerve. *J Neurosci Res* 39:127-139.
- Chae JH, Stein GH, Lee JE (2004) NeuroD: the predicted and the surprising. *Mol Cells* 18:271-288.
- Chao MV, Bothwell M (2002) Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron* 33:9-12.
- Chen P, Johnson JE, Zoghbi HY, Segil N (2002) The role of Math1 in inner ear development: Uncoupling the establishment of the sensory primordium from hair cell fate determination. *Development* 129:2495-2505.
- Chen P, Segil N (1999) p27(Kip1) links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Development* 126:1581-1590.
- Chen P, Zindy F, Abdala C, Liu F, Li X, Roussel MF, Segil N (2003) Progressive hearing loss in mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor Ink4d. *Nat Cell Biol* 5:422-426.
- Chen ZY (2006) Cell Cycle, Differentiation and Regeneration: Where to Begin? *Cell Cycle* 5.
- Cheung M, Briscoe J (2003) Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. *Development* 130:5681-5693.
- Cheung M, Chaboissier MC, Mynett A, Hirst E, Schedl A, Briscoe J (2005) The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Dev Cell* 8:179-192.

- Chisaka O, Musci TS, Capecchi MR (1992) Developmental defects of the ear, cranial nerves and hindbrain resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *Hox-1.6*. *Nature* 355:516-520.
- Choo D, Sanne JL, Wu DK (1998) The differential sensitivities of inner ear structures to retinoic acid during development. *Dev Biol* 204:136-150.
- Cohen-Salmon MDCF&PC (2005) *Connexins Responsible for Hereditary Deafness—The Tale Unfolds*. (Winterhager E, ed), pp 111-134. Berlin: Springer.
- Cohen-Salmon M, Regnault B, Cayet N, Caille D, Demuth K, Hardelin JP, Janel N, Meda P, Petit C (2007) Connexin30 deficiency causes intrastrial fluid-blood barrier disruption within the cochlear stria vascularis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6229-6234.
- Cole LK, Le R, I, Nunes F, Laufer E, Lewis J, Wu DK (2000) Sensory organ generation in the chicken inner ear: contributions of bone morphogenetic protein 4, *serrate1*, and *lunatic fringe*. *J Comp Neurol* 424:509-520.
- Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohen-Tannoudji M, Norris D, Rastan S, Stevanovic M, Goodfellow PN, Lovell-Badge R (1996) A comparison of the properties of *Sox-3* with *Sry* and two related genes, *Sox-1* and *Sox-2*. *Development* 122:509-520.
- 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.
- Connor F, Cary PD, Read CM, Preston NS, Driscoll PC, Denny P, Crane-Robinson C, Ashworth A (1994) DNA binding and bending properties of the post-meiotically expressed *Sry*-related protein *Sox-5*. *Nucleic Acids Res* 22:3339-3346.
- Cook AL, Smith AG, Smit DJ, Leonard JH, Sturm RA (2005) Co-expression of *SOX9* and *SOX10* during melanocytic differentiation in vitro. *Exp Cell Res* 308:222-235.
- 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.
- Corti A (1851) *Recherches sur l'organe de Corti de l'ouïe des mammifères*.
- Corwin JT, Cotanche DA (1988) Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science* 240:1772-1774.
- Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, Chen KS, Pitts-Meek S, Armanini MP, Ling LH, McMahon SB, Shelton DL, Levinson AD, . (1994) Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 76:1001-1011.
- Curtin JA, Quint E, Tshipouri V, Arkell RM, Cattanch B, Copp AJ, Henderson DJ, Spurr N, Stanier P, Fisher EM, Nolan PM, Steel KP, Brown SD, Gray IC, Murdoch JN (2003) Mutation of *Celsr1* Disrupts Planar Polarity of Inner Ear Hair Cells and Causes Severe Neural Tube Defects in the Mouse. *Curr Biol* 13:1129-1133.
- d'Aldin CG, Ruel J, Assie R, Pujol R, Puel JL (1997) Implication of NMDA type glutamate receptors in neural regeneration and neoformation of synapses after excitotoxic injury in the guinea pig cochlea. *Int J Dev Neurosci* 15:619-629.
- D'Amico-Martel A (1982) Temporal patterns of neurogenesis in avian cranial sensory and autonomic ganglia. *Am J Anat* 163:351-372.
- D'Amico-Martel A, Noden DM (1983) Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia. *Am J Anat* 166:445-468.
- Dabdoub A, Donohue MJ, Brennan A, Wolf V, Montcouquiol M, Sassoon DA, Hseih JC, Rubin JS, Salinas PC, Kelley MW (2003) Wnt signaling mediates reorientation of outer hair cell stereociliary bundles in the mammalian cochlea. *Development* 130:2375-2384.
- Dabdoub A, Kelley MW (2005) Planar cell polarity and a potential role for a Wnt morphogen gradient in stereociliary bundle orientation in the mammalian inner ear. *J Neurobiol* 64:446-457.
- Dai CF, Steyger PS, Wang ZM, Vass Z, Nuttall AL (2004) Expression of *Trk A* receptors in the mammalian inner ear. *Hear Res* 187:1-11.
- Daudet N, Vago P, Ripoll C, Humbert G, Pujol R, Lenoir M (1998) Characterization of atypical cells in the juvenile rat organ of corti after aminoglycoside ototoxicity. *J Comp Neurol* 401:145-162.
- Davies AM (1998a) Developmental changes in the neurotrophic factor survival requirements of peripheral nervous system neurons. *Prog Brain Res* 117:47-56.
- Davies AM (1998b) Neuronal survival: early dependence on Schwann cells. *Curr Biol* 8:R15-R18.
- Davies AM, Wright EM (1995) Neurotrophic factors. Neurotrophin autocrine loops. *Curr Biol* 5:723-726.
- De Moerlooze L., Spencer-Dene B, Revest J, Hajihosseini M, Rosewell I, Dickson C (2000) An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (*FGFR2*) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development* 127:483-492.



- Delpire E, Lu J, England R, Dull C, Thorne T (1999) Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat Genet* 22:192-195.
- Depew MJ, Liu JK, Long JE, Presley R, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL (1999) Dlx5 regulates regional development of the branchial arches and sensory capsules. *Development* 126:3831-3846.
- Dixon MJ, Gazzard J, Chaudhry SS, Sampson N, Schulte BA, Steel KP (1999) Mutation of the Na-K-Cl co-transporter gene *Slc12a2* results in deafness in mice. *Hum Mol Genet* 8:1579-1584.
- Drici MD, Arrighi I, Chouabe C, Mann JR, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J (1998) Involvement of *IsK*-associated K<sup>+</sup> channel in heart rate control of repolarization in a murine engineered model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Circ Res* 83:95-102.
- Du X, Jensen P, Goldowitz D, Hamre KM (2007) Wild-type cells rescue genotypically *Math1*-null hair cells in the inner ears of chimeric mice. *Dev Biol* 305:430-438.
- Dupe V, Ghyselinck NB, Wendling O, Chambon P, Mark M (1999) Key roles of retinoic acid receptors alpha and beta in the patterning of the caudal hindbrain, pharyngeal arches and otocyst in the mouse. *Development* 126:5051-5059.
- Dutton KA, Pauliny A, Lopes SS, Elworthy S, Carney TJ, Rauch J, Geisler R, Haffter P, Kelsh RN (2001) Zebrafish *colourless* encodes *sox10* and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. *Development* 128:4113-4125.
- Eddison M, Le R, I, Lewis J (2000) Notch signaling in the development of the inner ear: lessons from *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11692-11699.
- Ederly P, Attie T, Amiel J, Pelet A, Eng C, Hofstra RM, Martelli H, Bidaud C, Munnich A, Lyonnet S (1996) Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet* 12:442-444.
- Ernfors P, Merlio JP, Persson H (1992) Cells Expressing mRNA for Neurotrophins and their Receptors During Embryonic Rat Development. *Eur J Neurosci* 4:1140-1158.
- Ernfors P, Van De Water TR, Loring J, Jaenisch R (1995) Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron* 14:1153-1164.
- Escurat M, Djabali K, Gumpel M, Gros F, Portier MM (1990) Differential expression of two neuronal intermediate-filament proteins, peripherin and the low-molecular-mass neurofilament protein (NF-L), during the development of the rat. *J Neurosci* 10:764-784.
- Falls DL (2003) Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284:14-30.
- Fanto M, McNeill H (2004) Planar polarity from flies to vertebrates. *J Cell Sci* 117:527-533.
- Farinas I, Jones KR, Backus C, Wang XY, Reichardt LF (1994) Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. *Nature* 369:658-661.
- Farinas I, Jones KR, Tessarollo L, Vigers AJ, Huang E, Kirstein M, de Caprona DC, Coppola V, Backus C, Reichardt LF, Fritsch B (2001) Spatial shaping of cochlear innervation by temporally regulated neurotrophin expression. *Journal of Neuroscience* 21:6170-6180.
- Favor J, Sandulache R, Neuhauser-Klaus A, Pretsch W, Chatterjee B, Senft E, Wurst W, Blanquet V, Grimes P, Sporle R, Schughart K (1996) The mouse *Pax2(1<sup>Neu</sup>)* mutation is identical to a human *PAX2* mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain, ear, eye, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13870-13875.
- Fechner FP, Nadol JB, Jr., Burgess BJ, Brown MC (2001) Innervation of supporting cells in the apical turns of the guinea pig cochlea is from type II afferent fibers. *J Comp Neurol* 429:289-298.
- Fekete DM, Campero AM (2007) Axon guidance in the inner ear. *Int J Dev Biol* 51:549-556.
- Fekete DM, Wu DK (2002) Revisiting cell fate specification in the inner ear. *Curr Opin Neurobiol* 12:35-42.
- Fernandez-Lloris R, Osses N, Jaffray E, Shen LN, Vaughan OA, Girwood D, Bartrons R, Rosa JL, Hay RT, Ventura F (2006) Repression of SOX6 transcriptional activity by SUMO modification. *FEBS Lett* 580:1215-1221.
- Flagella M, Clarke LL, Miller ML, Erway LC, Giannella RA, Andringa A, Gawenis LR, Kramer J, Duffy JJ, Doetschman T, Lorenz JN, Yamoah EN, Cardell EL, Shull GE (1999) Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf. *J Biol Chem* 274:26946-26955.
- Forge A, Li L, Corwin JT, Nevill G (1993) Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear. *Science* 259:1616-1619.
- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kowk G, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, . (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372:525-530.
- Friedman RA, Makmura L, Biesiada E, Wang X, Keithley EM (2005) *Eya1* acts upstream of *Tbx1*, *Neurogenin 1*, *NeuroD* and the neurotrophins BDNF and NT-3 during inner ear development. *Mech Dev* 122:625-634.

- Friedman TB, Hinnant JT, Fridell RA, Wilcox ER, Raphael Y, Camper SA (2000) DFNB3 families and Shaker-2 mice: mutations in an unconventional myosin, myo 15. *Adv Otorhinolaryngol* 56:131-144.
- Fritzsich B (1996) How does the urodele ear develop? *Int J Dev Biol* 40:763-771.
- Fritzsich B, Barbacid M, Silos-Santiago I (1998) The combined effects of trkB and trkC mutations on the innervation of the inner ear. *Int J Dev Neurosci* 16:493-505.
- Fritzsich B, Beisel K (1998) Development and maintenance of ear innervation and function: lessons from mutations in mouse and man. *Am J Hum Genet* 63:1263-1270.
- Fritzsich B, Beisel KW (2004) Keeping sensory cells and evolving neurons to connect them to the brain: molecular conservation and novelties in vertebrate ear development. *Brain Behav Evol* 64:182-197.
- Fritzsich B, Beisel KW, Jones K, Farinas I, Maklad A, Lee J, Reichardt LF (2002) Development and evolution of inner ear sensory epithelia and their innervation. *Journal of Neurobiology* 53:143-156.
- Fritzsich B, Silos-Santiago I, Bianchi LM, Farinas I, I (1997b) Effects of neurotrophin and neurotrophin receptor disruption on the afferent inner ear innervation. *Semin Cell Dev Biol* 8:277-284.
- Fritzsich B, Silos-Santiago I, Bianchi LM, Farinas I (1997a) Effects of neurotrophin and neurotrophin receptor disruption on the afferent inner ear innervation. *Semin Cell Dev Biol* 8:277-284.
- Gavalas A, Studer M, Lumsden A, Rijli FM, Krumlauf R, Chambon P (1998) Hoxa1 and Hoxb1 synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. *Development* 125:1123-1136.
- Gazit R, Krizhanovsky V, Ben-Arie N (2004) Math1 controls cerebellar granule cell differentiation by regulating multiple components of the Notch signaling pathway. *Development* 131:903-913.
- Giese K, Cox J, Grosschedl R (1992) The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* 69:185-195.
- Gill G (2005) SUMO changes Sox for developmental diversity. *Mol Cell* 20:495-496.
- Gillespie LN, Clark GM, Bartlett PF, Marzella PL (2001) LIF is more potent than BDNF in promoting neurite outgrowth of mammalian auditory neurons in vitro. *Neuroreport* 12:275-279.
- Girdwood D, Bumpass D, Vaughan OA, Thain A, Anderson LA, Snowden AW, Garcia-Wilson E, Perkins ND, Hay RT (2003) P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* 11:1043-1054.
- Gorham JD, Baker H, Kegler D, Ziff EB (1990) The expression of the neuronal intermediate filament protein peripherin in the rat embryo. *Brain Res Dev Brain Res* 57:235-248.
- Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, Sandy P, Schwarz SE, Scheffner M, Del SG (1999) Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J* 18:6462-6471.
- Gow A, Davies C, Southwood CM, Frolenkov G, Chrustowski M, Ng L, Yamauchi D, Marcus DC, Kachar B (2004) Deafness in Claudin 11-null mice reveals the critical contribution of basal cell tight junctions to stria vascularis function. *J Neurosci* 24:7051-7062.
- Gratton MA, Schulte BA (1995) Alterations in microvasculature are associated with atrophy of the stria vascularis in quiet-aged gerbils. *Hear Res* 82:44-52.
- Groves AK, Bronner F (2000) Competence, specification and commitment in otic placode induction. *Development* 127:3489-3499.
- Gubb D, Garcia-Bellido A (1982) A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* 68:37-57.
- Guild (1931) Correlations of Differences in the Density of Innervation of the Organ of Corti with Differences in the Acuity of Hearing, Including Evidence as to the Location in the Human Cochlea of the Receptors for Certain Tones. *Acta Oto-Laryngologica* XV:269-308.
- Guillemot F (2007) Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development* 134:3771-3780.
- Habas R, Dawid IB, He X (2003) Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev* 17:295-309.
- Habas R, Kato Y, He X (2001) Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* 107:843-854.
- Hackney CM, Mahendrasingam S, Penn A, Fettiplace R (2005) The concentrations of calcium buffering proteins in mammalian cochlear hair cells. *J Neurosci* 25:7867-7875.
- Haddon C, Smithers L, Schneider-Maunoury S, Coche T, Henrique D, Lewis J (1998) Multiple delta genes and lateral inhibition in zebrafish primary neurogenesis. *Development* 125:359-370.

- Hadrys T, Braun T, Rinkwitz-Brandt S, Arnold HH, Bober E (1998) Nkx5-1 controls semicircular canal formation in the mouse inner ear. *Development* 125:33-39.
- Hafidi A (1998) Peripherin-like immunoreactivity in type II spiral ganglion cell body and projections. *Brain Res* 805:181-190.
- Hafidi A, Despres G, Romand R (1993) Ontogenesis of type II spiral ganglion neurons during development: peripherin immunohistochemistry. *Int J Dev Neurosci* 11:507-512.
- Hanani M (2005) Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Brain Res Rev* 48:457-476.
- Hansen MR, Vijapurkar U, Koland JG, Green SH (2001a) Reciprocal signaling between spiral ganglion neurons and Schwann cells involves neuregulin and neurotrophins. *Hear Res* 161:87-98.
- Hansen MR, Zha XM, Bok J, Green SH (2001b) Multiple distinct signal pathways, including an autocrine neurotrophic mechanism, contribute to the survival-promoting effect of depolarization on spiral ganglion neurons in vitro. *J Neurosci* 21:2256-2267.
- Harley VR, Goodfellow PN (1994) The biochemical role of SRY in sex determination. *Mol Reprod Dev* 39:184-193.
- Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1994) Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res* 22:1500-1501.
- 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.
- Hatch EP, Noyes CA, Wang X, Wright TJ, Mansour SL (2007) Fgf3 is required for dorsal patterning and morphogenesis of the inner ear epithelium. *Development* 134:3615-3625.
- Hay RT (2005) SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18:1-12.
- Hay RT (2006) Role of ubiquitin-like proteins in transcriptional regulation. *Ernst Schering Res Found Workshop* 173-192.
- Hay RT (2007) SUMO-specific proteases: a twist in the tail. *Trends Cell Biol* 17:370-376.
- 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.
- Helfand BT, Mendez MG, Pugh J, Delsert C, Goldman RD (2003) A role for intermediate filaments in determining and maintaining the shape of nerve cells. *Mol Biol Cell* 14:5069-5081.
- Herbarth B, Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Hermans-Borgmeyer I, Puliti A, Lemort N, Goossens M, Wegner M (1998) Mutation of the Sry-related Sox10 gene in Dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5161-5165.
- Hibino H, Horio Y, Inanobe A, Doi K, Ito M, Yamada M, Gotow T, Uchiyama Y, Kawamura M, Kubo T, Kurachi Y (1997) An ATP-dependent inwardly rectifying potassium channel, KAB-2 (Kir4.1), in cochlear stria vascularis of inner ear: its specific subcellular localization and correlation with the formation of endocochlear potential. *J Neurosci* 17:4711-4721.
- Hibino H, Kurachi Y (2006) Molecular and physiological bases of the K<sup>+</sup> circulation in the mammalian inner ear. *Physiology (Bethesda)* 21:336-345.
- Hilding DA, Bahia I, Ginzberg RD (1977) Glycogen in the cochlea during development. *Acta Otolaryngol* 84:12-23.
- Hirth F, Therianos S, Loop T, Gehring WJ, Reichert H, Furukubo-Tokunaga K (1995) Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes orthodenticle and empty spiracles in *Drosophila*. *Neuron* 15:769-778.
- Hong CS, Saint-Jeannet JP (2005) Sox proteins and neural crest development. *Semin Cell Dev Biol*.
- Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Mayhew CN, Goodson ML, Park-Sarge OK, Sarge KD (2001) Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 276:40263-40267.
- Honore SM, Aybar MJ, Mayor R (2003) Sox10 is required for the early development of the prospective neural crest in *Xenopus* embryos. *Dev Biol* 260:79-96.
- Hornyak TJ, Hayes DJ, Chiu LY, Ziff EB (2001) Transcription factors in melanocyte development: distinct roles for Pax-3 and Mitf. *Mech Dev* 101:47-59.
- Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, Yanagisawa M (1994) Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 79:1267-1276.
- Hossain WA, Morest DK (2000) Fibroblast growth factors (FGF-1, FGF-2) promote migration and neurite growth of mouse cochlear ganglion cells in vitro: immunohistochemistry and antibody perturbation. *J Neurosci Res* 62:40-55.
- Hossain WA, Zhou X, Rutledge A, Baier C, Morest DK (1996) Basic fibroblast growth factor affects neuronal migration and differentiation in normotypic cell cultures from the cochleovestibular ganglion of the chick embryo. *Exp Neurol* 138:121-143.

- Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.
- Huang HC, Klein PS (2004) The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol* 5:234.
- Hume CR, Dodd J (1993) Cwnt-8C: a novel Wnt gene with a potential role in primitive streak formation and hindbrain organization. *Development* 119:1147-1160.
- Hume CR, Kirkegaard M, Oesterle EC (2003) ErbB Expression: The Mouse Inner Ear and Maturation of the Mitogenic Response to Heregulin. *J Assoc Res Otolaryngol*.
- Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171:939-945.
- Inoue K, Khajavi M, Ohyama T, Hirabayashi S, Wilson J, Reggin JD, Mancias P, Butler IJ, Wilkinson MF, Wegner M, Lupski JR (2004) Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nat Genet* 36:361-369.
- Inoue K, Shilo K, Boerkoel CF, Crowe C, Sawady J, Lupski JR, Agamanolis DP (2002) Congenital hypomyelinating neuropathy, central dysmyelination, and Waardenburg-Hirschsprung disease: phenotypes linked by SOX10 mutation. *Ann Neurol* 52:836-842.
- Inoue K, Tanabe Y, Lupski JR (1999) Myelin deficiencies in both the central and the peripheral nervous systems associated with a SOX10 mutation. *Ann Neurol* 46:313-318.
- Itoh K, Krupnik VE, Sokol SY (1998) Axis determination in *Xenopus* involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and beta-catenin. *Curr Biol* 8:591-594.
- Iwamoto T, Takahashi M, Ohbayashi M, Nakashima I (1992) The ret oncogene can induce melanogenesis and melanocyte development in Wv/Wv mice. *Exp Cell Res* 200:410-415.
- Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, Abrashkin KA, Swiderski DL, Dolan DF, Brough DE, Raphael Y (2005) Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 11:271-276.
- Jan AY, Amin S, Ratajczak P, Richard G, Sybert VP (2004) Genetic heterogeneity of KID syndrome: identification of a Cx30 gene (GJB6) mutation in a patient with KID syndrome and congenital atrichia. *J Invest Dermatol* 122:1108-1113.
- Jenny A, Reynolds-Kenneally J, Das G, Burnett M, Mlodzik M (2005) Diego and Prickle regulate Frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding. *Nat Cell Biol* 7:691-697.
- Jentsch TJ (2000) Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 1:21-30.
- Jessen KR, Morgan L, Stewart HJ, Mirsky R (1990) Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions. *Development* 109:91-103.
- Jiao Z, Mollaaghababa R, Pavan WJ, Antonellis A, Green ED, Hornyak TJ (2004) Direct interaction of Sox10 with the promoter of murine Dopachrome Tautomerase (Dct) and synergistic activation of Dct expression with Mitf. *Pigment Cell Res* 17:352-362.
- Jin Z, Mannstrom P, Jarlebark L, Ulfendahl M (2007) Malformation of stria vascularis in the developing inner ear of the German waltzing guinea pig. *Cell Tissue Res* 328:257-270.
- Johnson KR, Cook SA, Erway LC, Matthews AN, Sanford LP, Paradies NE, Friedman RA (1999) Inner ear and kidney anomalies caused by IAP insertion in an intron of the *Eya1* gene in a mouse model of BOR syndrome. *Hum Mol Genet* 8:645-653.
- Jones C, Chen P (2007) Planar cell polarity signaling in vertebrates. *Bioessays* 29:120-132.
- Jones JM, Montcouquiol M, Dabdoub A, Woods C, Kelley MW (2006) Inhibitors of differentiation and DNA binding (Ids) regulate Math1 and hair cell formation during the development of the organ of Corti. *J Neurosci* 26:550-558.
- Kalatzis V, Sahly I, El Amraoui A, Petit C (1998) *Eya1* expression in the developing ear and kidney: towards the understanding of the pathogenesis of Branchio-Oto-Renal (BOR) syndrome. *Dev Dyn* 213:486-499.
- Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H (2000) Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* 16:182-187.
- Kapur RP (1999) Early death of neural crest cells is responsible for total enteric aganglionosis in Sox10(Dom)/Sox10(Dom) mouse embryos. *Pediatr Dev Pathol* 2:559-569.
- Karis A, Pata I, van Doorninck JH, Grosveld F, de Zeeuw CI, de Caprona D, Fritsch B (2001) Transcription factor GATA-3 alters pathway selection of olivocochlear neurons and affects morphogenesis of the ear. *Journal of Comparative Neurology* 429:615-630.
- Kawamoto K, Ishimoto S, Minoda R, Brough DE, Raphael Y (2003) Math1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs in vivo. *J Neurosci* 23:4395-4400.
- Kawasaki T, Oka N, Tachibana H, Akiguchi I, Shibasaki H (2003) Oct6, a transcription factor controlling myelination, is a marker for active nerve regeneration in peripheral neuropathies. *Acta Neuropathol* 105:203-208.

- Keller R (2002) Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* 298:1950-1954.
- Kellerer S, Schreiner S, Stolt CC, Scholz S, Bosl MR, Wegner M (2006) Replacement of the Sox10 transcription factor by Sox8 reveals incomplete functional equivalence. *Development* 133:2875-2886.
- Kelley M (2001) *Handbook of Mouse Auditory Research : From Behavior to Molecular Biology*. (J.F. Willott, ed), New York.
- Kelley MW (2006) Hair cell development: commitment through differentiation. *Brain Res* 1091:172-185.
- Kelsh RN, Raible DW (2002) Specification of zebrafish neural crest. *Results Probl Cell Differ* 40:216-236.
- Kennedy CL, Koopman P, Mishina Y, O'Bryan MK (2008) Sox8 and Sertoli-cell Function. *Ann N Y Acad Sci* 1120:104-113.
- Kharkovets T, Hardelin JP, Safieddine S, Schweizer M, El Amraoui A, Petit C, Jentsch TJ (2000) KCNQ4, a K<sup>+</sup> channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4333-4338.
- Kibar Z, Vogan KJ, Groulx N, Justice MJ, Underhill DA, Gros P (2001) Ltap, a mammalian homolog of *Drosophila* Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nat Genet* 28:251-255.
- Kiernan AE, Ahituv N, Fuchs H, Balling R, Avraham KB, Steel KP, Hrabe dA (2001) The Notch ligand Jagged1 is required for inner ear sensory development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3873-3878.
- 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.
- Kikkawa Y, Miura I, Takahama S, Wakana S, Yamazaki Y, Moriwaki K, Shiroishi T, Yonekawa H (2001) Microsatellite database for MSM/Ms and JF1/Ms, molossinus-derived inbred strains. *Mamm Genome* 12:750-752.
- Kikuchi T, Adams JC, Miyabe Y, So E, Kobayashi T (2000) Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electron Microsc* 33:51-56.
- Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Adams JC (1995) Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol (Berl)* 191:101-118.
- Kim J, Lo L, Dormand E, Anderson DJ (2003) SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron* 38:17-31.
- Kim WY, Fritsch B, Serls A, Bakel LA, Huang EJ, Reichardt LF, Barth DS, Lee JE (2001) NeuroD-null mice are deaf due to a severe loss of the inner ear sensory neurons during development. *Development* 128:417-426.
- Kishida M, Koyama S, Kishida S, Matsubara K, Nakashima S, Higano K, Takada R, Takada S, Kikuchi A (1999) Axin prevents Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. *Oncogene* 18:979-985.
- Kitajiri S, Miyamoto T, Mineharu A, Sonoda N, Furuse K, Hata M, Sasaki H, Mori Y, Kubota T, Ito J, Furuse M, Tsukita S (2004a) Compartmentalization established by claudin-11-based tight junctions in stria vascularis is required for hearing through generation of endocochlear potential. *J Cell Sci* 117:5087-5096.
- Kitajiri SI, Furuse M, Morita K, Saishin-Kiuchi Y, Kido H, Ito J, Tsukita S (2004b) Expression patterns of claudins, tight junction adhesion molecules, in the inner ear. *Hear Res* 187:25-34.
- Klein TJ, Mlodzik M (2005) Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:155-176.
- Knipper M, Bandtlow C, Gestwa L, Kopschall I, Rohbock K, Wiechers B, Zenner HP, Zimmermann U (1998) Thyroid hormone affects Schwann cell and oligodendrocyte gene expression at the glial transition zone of the VIIIth nerve prior to cochlea function. *Development* 125:3709-3718.
- Koide T, Moriwaki K, Uchida K, Mita A, Sagai T, Yonekawa H, Katoh H, Miyashita N, Tsuchiya K, Nielsen TJ, Shiroishi T (1998) A new inbred strain JF1 established from Japanese fancy mouse carrying the classic piebald allele. *Mamm Genome* 9:15-19.
- Koitchev K, Guillaume A, Cazals Y, Aran JM (1982) Spiral ganglion changes after massive aminoglycoside treatment in the guinea pig. Counts and ultrastructure. *Acta Otolaryngol* 94:431-438.
- Komatsu T, Mizusaki H, Mukai T, Ogawa H, Baba D, Shirakawa M, Hatakeyama S, Nakayama KI, Yamamoto H, Kikuchi A, Morohashi K (2004) Small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1) modification of the synergy control motif of Ad4 binding protein/steroidogenic factor 1 (Ad4BP/SF-1) regulates synergistic transcription between Ad4BP/SF-1 and Sox9. *Mol Endocrinol* 18:2451-2462.
- Koopman P, Schepers G, Brenner S, Venkatesh B (2004) Origin and diversity of the SOX transcription factor gene family: genome-wide analysis in *Fugu rubripes*. *Gene* 328:177-186.

- Kordes U, Cheng YC, Scotting PJ (2005) Sox group E gene expression distinguishes different types and maturational stages of glial cells in developing chick and mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 157:209-213.
- Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT (2000) The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 16:279-283.
- Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M (1998a) Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci* 18:237-250.
- Kuhlbrodt K, Schmidt C, Sock E, Pingault V, Bondurand N, Goossens M, Wegner M (1998b) Functional analysis of Sox10 mutations found in human Waardenburg-Hirschsprung patients. *J Biol Chem* 273:23033-23038.
- Kumar NM, Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-388.
- Kuntz AL, Oesterle EC (1998a) Transforming growth factor alpha with insulin stimulates cell proliferation in vivo in adult rat vestibular sensory epithelium. *J Comp Neurol* 399:413-423.
- Kuntz AL, Oesterle EC (1998b) Transforming growth factor-alpha with insulin induces proliferation in rat utricular extrasensory epithelia. *Otolaryngol Head Neck Surg* 118:816-824.
- Ladher RK, Anakwe KU, Gurney AL, Schoenwolf GC, Francis-West PH (2000) Identification of synergistic signals initiating inner ear development. *Science* 290:1965-1967.
- Ladher RK, Wright TJ, Moon AM, Mansour SL, Schoenwolf GC (2005) FGF8 initiates inner ear induction in chick and mouse. *Genes Dev* 19:603-613.
- Lallemend F, Lefebvre PP, Hans G, Rigo JM, Van De Water TR, Moonen G, Malgrange B (2003) Substance P protects spiral ganglion neurons from apoptosis via PKC-Ca<sup>2+</sup>-MAPK/ERK pathways. *J Neurochem* 87:508-521.
- Lanford PJ, Lan Y, Jiang RL, Lindsell C, Weinmaster G, Gridley T, Kelley MW (1999) Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nat Genet* 21:289-292.
- Lang D, Chen F, Milewski R, Li J, Lu MM, Epstein JA (2000) Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with Sox10 to modulate expression of c-ret. *J Clin Invest* 106:963-971.
- Lang D, Epstein JA (2003) Sox10 and Pax3 physically interact to mediate activation of a conserved c-RET enhancer. *Hum Mol Genet* 12:937-945.
- Lang H, Schulte BA, Schmiedt RA (2005) Ouabain induces apoptotic cell death in type I spiral ganglion neurons, but not type II neurons. *J Assoc Res Otolaryngol* 6:63-74.
- Lariviere RC, Julien JP (2004) Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol* 58:131-148.
- Larsen CW, Zeltser LM, Lumsden A (2001) Boundary formation and compartment in the avian diencephalon. *J Neurosci* 21:4699-4711.
- Lawoko-Kerali G, Rivolta MN, Holley M (2002) Expression of the transcription factors GATA3 and Pax2 during development of the mammalian inner ear. *Journal of Comparative Neurology* 442:378-391.
- Lawoko-Kerali G, Rivolta MN, Lawlor P, Cacciabue-Rivolta DI, Langton-Hewer C, van Doorninck JH, Holley MC (2004) GATA3 and NeuroD distinguish auditory and vestibular neurons during development of the mammalian inner ear. *Mech Dev* 121:287-299.
- Le Douarin N. (1980) Migration and differentiation of neural crest cells. *Curr Top Dev Biol* 16:31-85.
- Le Douarin NM (1975) The neural crest in the neck and other parts of the body. *Birth Defects Orig Artic Ser* 11:19-50.
- Le Douarin NM (1980) The ontogeny of the neural crest in avian embryo chimaeras. *Nature* 286:663-669.
- Le Douarin NM (1984) Ontogeny of the peripheral nervous system from the neural crest and the placodes. A developmental model studied on the basis of the quail-chick chimaera system. *Harvey Lect* 80:137-186.
- Le Douarin NM, Dupin E (2003) Multipotentiality of the neural crest. *Curr Opin Genet Dev* 13:529-536.
- Le Douarin NM, Teillet MA (1973) The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol* 30:31-48.
- Leake PA, Hradek GT (1988) Cochlear pathology of long term neomycin induced deafness in cats. *Hear Res* 33:11-33.
- Lecomte MJ, Basseville M, Landon F, Karpov V, Fauquet M (1998) Transcriptional activation of the mouse peripherin gene by leukemia inhibitory factor: involvement of STAT proteins. *J Neurochem* 70:971-982.
- Lee M, Goodall J, Verastegui C, Ballotti R, Goding CR (2000a) Direct regulation of the Microphthalmia promoter by Sox10 links Waardenburg-Shah syndrome (WS4)-associated hypopigmentation and deafness to WS2. *J Biol Chem* 275:37978-37983.

- Lee MP, Ravenel JD, Hu RJ, Lustig LR, Tomaselli G, Berger RD, Brandenburg SA, Litzl TJ, Bunton TE, Limb C, Francis H, Gorelikow M, Gu H, Washington K, Argani P, Goldenring JR, Coffey RJ, Feinberg AP (2000b) Targeted disruption of the *Kvlqt1* gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice. *J Clin Invest* 106:1447-1455.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294:1945-1948.
- 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.
- Lefebvre PP, Malgrange B, Staecker H, Moghadass M, Van De Water TR, Moonen G (1994) Neurotrophins affect survival and neurogenesis by adult injured auditory neurons in vitro. *Neuroreport* 5:865-868.
- Lefebvre V, Li P, de CB (1998) A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J* 17:5718-5733.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585-595.
- Lenoir M, Pujol R (1980) Sensitive period to acoustic trauma in the rat pup cochlea. Histological findings. *Acta Otolaryngol* 89:317-322.
- Levic S, Nie L, Tuteja D, Harvey M, Sokolowski BH, Yamoah EN (2007) Development and regeneration of hair cells share common functional features. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19108-19113.
- Lewis AK, Frantz GD, Carpenter DA, de Sauvage FJ, Gao WQ (1998) Distinct expression patterns of notch family receptors and ligands during development of the mammalian inner ear. *Mech Dev* 78:159-163.
- Li L, Forge A (1997) Morphological evidence for supporting cell to hair cell conversion in the mammalian utricular macula. *Int J Dev Neurosci* 15:433-446.
- Li M, Tian Y, Fritsch B, Gao J, Wu X, Zuo J (2004) Inner hair cell Cre-expressing transgenic mouse. *Genesis* 39:173-177.
- Li M, Zhao C, Wang Y, Zhao Z, Meng A (2002) Zebrafish *sox9b* is an early neural crest marker. *Dev Genes Evol* 212:203-206.
- Liebl DJ, Tessarollo L, Palko ME, Parada LF (1997) Absence of sensory neurons before target innervation in brain-derived neurotrophic factor-, neurotrophin 3-, and TrkC-deficient embryonic mice. *J Neurosci* 17:9113-9121.
- Lillevali K, Haugas M, Matilainen T, Pussinen C, Karis A, Salminen M (2006) Gata3 is required for early morphogenesis and Fgf10 expression during otic development. *Mech Dev* 123:415-429.
- Lillevali K, Matilainen T, Karis A, Salminen M (2004) Partially overlapping expression of Gata2 and Gata3 during inner ear development. *Dev Dyn* 231:775-781.
- Lim D, Rueda J (1992) Structural development of the cochlea. In: *Structural development of the cochlea* pp 33-58. New York: Elsevier.
- Lim DJ (1986) Functional structure of the organ of Corti: a review. *Hear Res* 22:117-146.
- Lim DJ, Anniko M (1985) Developmental morphology of the mouse inner ear. A scanning electron microscopic observation. *Acta Otolaryngol Suppl* 422:1-69.
- Liu M, Pereira FA, Price SD, Chu MJ, Shope C, Himes D, Eatock RA, Brownell WE, Lysakowski A, Tsai MJ (2000) Essential role of BETA2/NeuroD1 in development of the vestibular and auditory systems. *Genes Dev* 14:2839-2854.
- Liu W, Li G, Chien JS, Raft S, Zhang H, Chiang C, Frenz DA (2002) Sonic hedgehog regulates otic capsule chondrogenesis and inner ear development in the mouse embryo. *Dev Biol* 248:240-250.
- Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:781-810.
- Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, Dolle P, Dierich A, Gorry P, Gansmuller A, Chambon P (1994) Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* 120:2723-2748.
- Lombardo A, Slack JM (1998) Postgastrulation effects of fibroblast growth factor on *Xenopus* development. *Dev Dyn* 212:75-85.
- 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<sup>Kip1</sup> allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of Corti. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 96:4084-4088.
- Ludwig A, Rehberg S, Wegner M (2004) Melanocyte-specific expression of dopachrome tautomerase is dependent on synergistic gene activation by the Sox10 and Mitf transcription factors. *FEBS Lett* 556:236-244.
- Lufkin T, Dierich A, LeMeur M, Mark M, Chambon P (1991) Disruption of the Hox-1.6 homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression. *Cell* 66:1105-1119.
- Lyst MJ, Stancheva I (2007) A role for SUMO modification in transcriptional repression and activation. *Biochem Soc Trans* 35:1389-1392.

- Ma QF, Anderson DJ, Fritsch B (2000) Neurogenin 1 null mutant ears develop fewer, morphologically normal hair cells in smaller sensory epithelia devoid of innervation. *Jaro* 1:129-143.
- Madden C, Halsted MJ, Hopkin RJ, Choo DI, Benton C, Greinwald JH, Jr. (2003) Temporal bone abnormalities associated with hearing loss in Waardenburg syndrome. *Laryngoscope* 113:2035-2041.
- Mahmood R, Kiefer P, Guthrie S, Dickson C, Mason I (1995) Multiple roles for FGF-3 during cranial neural development in the chicken. *Development* 121:1399-1410.
- Maka M, Stolt CC, Wegner M (2005) Identification of Sox8 as a modifier gene in a mouse model of Hirschsprung disease reveals underlying molecular defect. *Dev Biol* 277:155-169.
- Malgrange B, Belachew S, Thiry M, Nguyen L, Rogister B, Alvarez ML, Rigo JM, Van De Water TR, Moonen G, Lefebvre PP (2002a) Proliferative generation of mammalian auditory hair cells in culture. *Mech Dev* 112:79-88.
- Malgrange B, Knockaert M, Belachew S, Nguyen L, Moonen G, Meijer L, Lefebvre PP (2003) Inhibition of cyclin-dependent kinases induces differentiation of supernumerary hair cells and Deiters' cells in the developing organ of Corti. *FASEB J* 17:2136-2138.
- Malgrange B, Lefebvre P, Van De Water TR, Staecker H, Moonen G (1996) Effects of neurotrophins on early auditory neurones in cell culture. *Neuroreport* 7:913-917.
- Malgrange B, Thiry M, Van De Water TR, Nguyen L, Moonen G, Lefebvre PP (2002b) 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.
- Mansour SL, Goddard JM, Capecchi MR (1993) Mice homozygous for a targeted disruption of the proto-oncogene int-2 have developmental defects in the tail and inner ear. *Development* 117:13-28.
- Mantela J, Jiang Z, Ylikoski J, Fritsch B, Zacksenhaus E, Pirvola U (2005) The retinoblastoma gene pathway regulates the postmitotic state of hair cells of the mouse inner ear. *Development* 132:2377-2388.
- Marcus DC, Wu T, Wangemann P, Kofuji P (2002) KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C403-C407.
- Marcus RE (1968) Vestibular function and additional findings in Waardenburg's syndrome. *Acta OtolaryngolSuppl*-30.
- Mark M, Lufkin T, Dolle P, Dierich A, LeMeur M, Chambon P (1993a) Roles of Hox genes: what we have learnt from gain of function and loss of function mutations in the mouse. *C R Acad Sci III* 316:995-1008.
- Mark M, Lufkin T, Vonesch JL, Ruberte E, Olivo JC, Dolle P, Gorry P, Lumsden A, Chambon P (1993b) Two rhombomeres are altered in Hoxa-1 mutant mice. *Development* 119:319-338.
- Matheny C, DiStefano PS, Milbrandt J (1992) Differential activation of NGF receptor and early response genes in neural crest-derived cells. *Brain Res Mol Brain Res* 13:75-81.
- Matter K, Balda MS (2003a) Functional analysis of tight junctions. *Methods* 30:228-234.
- Matter K, Balda MS (2003b) Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:225-236.
- McKenzie E, Krupin A, Kelley MW (2004) Cellular growth and rearrangement during the development of the mammalian organ of Corti. *Dev Dyn* 229:802-812.
- Melnikova IN, Lin HR, Blanchette AR, Gardner PD (2000a) Synergistic transcriptional activation by Sox10 and Sp1 family members. *Neuropharmacology* 39:2615-2623.
- Melnikova IN, Yang Y, Gardner PD (2000b) Interactions between regulatory proteins that bind to the nicotinic receptor beta4 subunit gene promoter. *Eur J Pharmacol* 393:75-83.
- Merchant SN, McKenna MJ, Baldwin CT, Milunsky A, Nadol JB, Jr. (2001) Otopathology in a case of type I Waardenburg's syndrome. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110:875-882.
- Merlo GR, Palaria L, Mantero S, Zerega B, Adamska M, Rinkwitz S, Bober E, Levi G (2002) The Dlx5 homeobox gene is essential for vestibular morphogenesis in the mouse embryo through a BMP4-mediated pathway. *Dev Biol* 248:157-169.
- Miller JM, Chi DH, O'Keefe LJ, Kruszka P, Raphael Y, Altschuler RA (1997) Neurotrophins can enhance spiral ganglion cell survival after inner hair cell loss. *Int J Dev Neurosci* 15:631-643.
- Miller JM, Le Prell CG, Prieskorn DM, Wys NL, Altschuler RA (2007) Delayed neurotrophin treatment following deafness rescues spiral ganglion cells from death and promotes regrowth of auditory nerve peripheral processes: effects of brain-derived neurotrophic factor and fibroblast growth factor. *J Neurosci Res* 85:1959-1969.
- Mirsky R, Jessen KR (1996) Schwann cell development, differentiation and myelination. *Curr Opin Neurobiol* 6:89-96.



- Mirsky R, Stewart HJ, Taberero A, Bradke F, Brennan A, Dong Z, Jessen KR (1996) Development and differentiation of Schwann cells. *Rev Neurol (Paris)* 152:308-313.
- Mlodzik M (1999) Planar polarity in the *Drosophila* eye: a multifaceted view of signaling specificity and cross-talk. *EMBO J* 18:6873-6879.
- Mlodzik M (2000) Spiny legs and prickled bodies: new insights and complexities in planar polarity establishment. *Bioessays* 22:311-315.
- Mlodzik M (2002) Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate *Drosophila* tissue polarity and vertebrate gastrulation? *Trends Genet* 18:564-571.
- Mollaaghababa R, Pavan WJ (2003) The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene* 22:3024-3034.
- Montcouquiol M, Crenshaw EB, III, Kelley MW (2006a) Noncanonical Wnt signaling and neural polarity. *Annu Rev Neurosci* 29:363-386.
- Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, Copeland NG, Jenkins NA, Kelley MW (2003) Identification of *Vangl2* and *Scrb1* as planar polarity genes in mammals. *Nature* 423:173-177.
- Montcouquiol M, Sans N, Huss D, Kach J, Dickman JD, Forge A, Rachel RA, Copeland NG, Jenkins NA, Bogani D, Murdoch J, Warchol ME, Wenthold RJ, Kelley MW (2006b) Asymmetric localization of *Vangl2* and *Fz3* indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals. *J Neurosci* 26:5265-5275.
- Morris JK, Lin W, Hauser C, Marchuk Y, Getman D, Lee KF (1999) Rescue of the cardiac defect in *ErbB2* mutant mice reveals essential roles of *ErbB2* in peripheral nervous system development. *Neuron* 23:273-283.
- Morris JK, Maklad A, Hansen LA, Feng F, Sorensen C, Lee KF, Macklin WB, Fritzsche B (2006) A disorganized innervation of the inner ear persists in the absence of *ErbB2*. *Brain Res* 1091:186-199.
- Morsli H, Choo D, Ryan A, Johnson R, Wu DK (1998) Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs. *J Neurosci* 18:3327-3335.
- Morsli H, Tuorto F, Choo D, Postiglione MP, Simeone A, Wu DK (1999) *Otx1* and *Otx2* activities are required for the normal development of the mouse inner ear. *Development* 126:2335-2343.
- 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.
- Nakashima T, Naganawa S, Sone M, Tominaga M, Hayashi H, Yamamoto H, Liu X, Nuttall AL (2003) Disorders of cochlear blood flow. *Brain Res Brain Res Rev* 43:17-28.
- Nardelli J, Thiesson D, Fujiwara Y, Tsai FY, Orkin SH (1999) Expression and genetic interaction of transcription factors *GATA-2* and *GATA-3* during development of the mouse central nervous system. *Dev Biol* 210:305-321.
- Neuberger TJ, Cornbrooks CJ (1989) Transient modulation of Schwann cell antigens after peripheral nerve transection and subsequent regeneration. *J Neurocytol* 18:695-710.
- Ng LJ, Wheatley S, Muscat GE, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E, Bell DM, Tam PP, Cheah KS, Koopman P (1997) *SOX9* binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol* 183:108-121.
- Niederreither K, Vermot J, Schaubaur B, Chambon P, Dolle P (2000) Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development* 127:75-85.
- Noramly S, Grainger RM (2002) Determination of the embryonic inner ear. *J Neurobiol* 53:100-128.
- Nubler-Jung K, Bonitz R, Sonnenschein M (1987) Cell polarity during wound healing in an insect epidermis. *Development* 100:163-170.
- O'Donnell M, Hong CS, Huang X, Delnicki RJ, Saint-Jeannet JP (2006) Functional analysis of *Sox8* during neural crest development in *Xenopus*. *Development* 133:3817-3826.
- Oblinger MM, Szumlas RA, Wong J, Liuzzi FJ (1989a) Changes in cytoskeletal gene expression affect the composition of regenerating axonal sprouts elaborated by dorsal root ganglion neurons in vivo. *J Neurosci* 9:2645-2653.
- Oblinger MM, Wong J, Parysek LM (1989b) Axotomy-induced changes in the expression of a type III neuronal intermediate filament gene. *J Neurosci* 9:3766-3775.
- Ohuchi H, Hori Y, Yamasaki M, Harada H, Sekine K, Kato S, Itoh N (2000) *FGF10* acts as a major ligand for *FGF receptor 2 IIIb* in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun* 277:643-649.
- Ohuchi H, Yasue A, Ono K, Sasaoka S, Tomonari S, Takagi A, Itakura M, Moriyama K, Noji S, Nohno T (2005) Identification of cis-element regulating expression of the mouse *Fgf10* gene during inner ear development. *Dev Dyn* 233:177-187.

- Ohyama T, Groves AK, Martin K (2007) The first steps towards hearing: mechanisms of otic placode induction. *Int J Dev Biol* 51:463-472.
- Ohyama T, Mohamed OA, Taketo MM, Dufort D, Groves AK (2006) Wnt signals mediate a fate decision between otic placode and epidermis. *Development* 133:865-875.
- Oliver D, Knipper M, Derst C, Fakler B (2003) Resting potential and submembrane calcium concentration of inner hair cells in the isolated mouse cochlea are set by KCNQ-type potassium channels. *J Neurosci* 23:2141-2149.
- Oosterwegel M, Timmerman J, Leiden J, Clevers H (1992) Expression of GATA-3 during lymphocyte differentiation and mouse embryogenesis. *Dev Immunol* 3:1-11.
- Orr-Urtreger A, Bedford MT, Burakova T, Arman E, Zimmer Y, Yayon A, Givol D, Lonai P (1993) Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev Biol* 158:475-486.
- Pace AJ, Lee E, Athirakul K, Coffman TM, O'Brien DA, Koller BH (2000) Failure of spermatogenesis in mouse lines deficient in the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter. *J Clin Invest* 105:441-450.
- Pack AK, Slepecky NB (1995) Cytoskeletal and calcium-binding proteins in the mammalian organ of Corti: cell type-specific proteins displaying longitudinal and radial gradients. *Hear Res* 91:119-135.
- Paratore C, Eichenberger C, Suter U, Sommer L (2002) Sox10 haploinsufficiency affects maintenance of progenitor cells in a mouse model of Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 11:3075-3085.
- Paratore C, Goerich DE, Suter U, Wegner M, Sommer L (2001) Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Development* 128:3949-3961.
- Parr BA, Shea MJ, Vassileva G, McMahon AP (1993) Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development* 119:247-261.
- Parysek LM, Chisholm RL, Ley CA, Goldman RD (1988) A type III intermediate filament gene is expressed in mature neurons. *Neuron* 1:395-401.
- Pasqualetti M, Neun R, Davenne M, Rijli FM (2001) Retinoic acid rescues inner ear defects in Hoxa1 deficient mice. *Nat Genet* 29:34-39.
- Pauley S, Wright TJ, Pirvola U, Ornitz D, Beisel K, Fritsch B (2003) Expression and function of FGF10 in mammalian inner ear development. *Dev Dyn* 227:203-215.
- Pearson BW (1975) Symposium. ENT for nonspecialists. The ear: structure and function. *Postgrad Med* 57:50-54.
- Peirano RI, Goerich DE, Riethmacher D, Wegner M (2000) Protein zero gene expression is regulated by the glial transcription factor Sox10. *Mol Cell Biol* 20:3198-3209.
- Peirano RI, Wegner M (2000) The glial transcription factor Sox10 binds to DNA both as monomer and dimer with different functional consequences. *Nucleic Acids Res* 28:3047-3055.
- Pevny L, Placzek M (2005) SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol* 15:7-13.
- Pevny LH, Lovell-Badge R (1997) Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev* 7:338-344.
- Pfeffer PL, Gerster T, Lun K, Brand M, Busslinger M (1998) Characterization of three novel members of the zebrafish Pax2/5/8 family: dependency of Pax5 and Pax8 expression on the Pax2.1 (noi) function. *Development* 125:3063-3074.
- Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Prehu MO, Puliti A, Herbarth B, Hermans-Borgmeyer I, Legius E, Matthijs G, Amiel J, Lyonnet S, Ceccherini I, Romeo G, Smith JC, Read AP, Wegner M, Goossens M (1998) SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet* 18:171-173.
- Pingault V, Guiochon-Mantel A, Bondurand N, Faure C, Lacroix C, Lyonnet S, Goossens M, Landrieu P (2000) Peripheral neuropathy with hypomyelination, chronic intestinal pseudo-obstruction and deafness: a developmental "neural crest syndrome" related to a SOX10 mutation. *Ann Neurol* 48:671-676.
- Pirvola U, Arumae U, Moshnyakov M, Palgi J, Saarma M, Ylikoski J (1994) Coordinated expression and function of neurotrophins and their receptors in the rat inner ear during target innervation. *Hear Res* 75:131-144.
- Pirvola U, Spencer-Dene B, Liang XQ, Kettunen I, Thesleff I, Fritsch B, Dickson C, Ylikoski J (2000) FGF/FGFR-2(IIIb) signaling is essential for inner ear morphogenesis. *Journal of Neuroscience* 20:6125-6134.
- Pirvola U, Ylikoski J (2003) Neurotrophic factors during inner ear development. *Curr Top Dev Biol* 57:207-223.
- Pirvola U, Zhang X, Mantela J, Ornitz DM, Ylikoski J (2004) Fgf9 signaling regulates inner ear morphogenesis through epithelial-mesenchymal interactions. *Dev Biol* 273:350-360.

- Potterf SB, Mollaaghababa R, Hou L, Southard-Smith EM, Hornyak TJ, Arnheiter H, Pavan WJ (2001) Analysis of SOX10 function in neural crest-derived melanocyte development: SOX10-dependent transcriptional control of dopachrome tautomerase. *Dev Biol* 237:245-257.
- Poulat F, Barbara PS, Desclozeaux M, Soullier S, Moniot B, Bonneaud N, Boizet B, Berta P (1997) The human testis determining factor SRY binds a nuclear factor containing PDZ protein interaction domains. *J Biol Chem* 272:7167-7172.
- Poulat F, Girard F, Chevron MP, Goze C, Rebillard X, Calas B, Lamb N, Berta P (1995) Nuclear localization of the testis determining gene product SRY. *J Cell Biol* 128:737-748.
- 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.
- Puel JL, Ruel J, Gervais dC, Pujol R (1998) Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss. *Neuroreport* 9:2109-2114.
- Puligilla C, Feng F, Ishikawa K, Bertuzzi S, Dabdoub A, Griffith AJ, Fritsch 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.
- Pusch C, Hustert E, Pfeifer D, Sudbeck P, Kist R, Roe B, Wang Z, Balling R, Blin N, Scherer G (1998) The SOX10/Sox10 gene from human and mouse: sequence, expression, and transactivation by the encoded HMG domain transcription factor. *Hum Genet* 103:115-123.
- Raphael Y, Altschuler RA (2003) Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull* 60:397-422.
- Rehberg S, Lischka P, Glaser G, Stamminger T, Wegner M, Rosorius O (2002) Sox10 is an active nucleocytoplasmic shuttle protein, and shuttling is crucial for Sox10-mediated transactivation. *Mol Cell Biol* 22:5826-5834.
- Represa J, Sanchez A, Miner C, Lewis J, Giraldez F (1990) Retinoic acid modulation of the early development of the inner ear is associated with the control of c-fos expression. *Development* 110:1081-1090.
- Rhrich-Haddout F, Klosen P, Portier MM, Horvat JC (1997) Expression of peripherin, NADPH-diaphorase and NOS in the adult rat neocortex. *Neuroreport* 8:3313-3316.
- Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S, Ramzan K, Khan SN, Chattaraj P, Friedman PL, Anderson JM, Belyantseva IA, Forge A, Riazuddin S, Friedman TB (2006a) Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet* 79:1040-1051.
- Riazuddin S, Khan SN, Ahmed ZM, Ghosh M, Caution K, Nazli S, Kabra M, Zafar AU, Chen K, Naz S, Antonellis A, Pavan WJ, Green ED, Wilcox ER, Friedman PL, Morell RJ, Riazuddin S, Friedman TB (2006b) Mutations in TRIOBP, which encodes a putative cytoskeletal-organizing protein, are associated with nonsyndromic recessive deafness. *Am J Hum Genet* 78:137-143.
- Riccomagno MM, Martinu L, Mulheisen M, Wu DK, Epstein DJ (2002) Specification of the mammalian cochlea is dependent on Sonic hedgehog. *Genes Dev* 16:2365-2378.
- Riccomagno MM, Takada S, Epstein DJ (2005) Wnt-dependent regulation of inner ear morphogenesis is balanced by the opposing and supporting roles of Shh. *Genes Dev* 19:1612-1623.
- Riethmacher D, Sonnenberg-Riethmacher E, Brinkmann V, Yamaai T, Lewin GR, Birchmeier C (1997) Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 389:725-730.
- Rinkwitz S, Bober E, Baker R (2001) Development of the vertebrate inner ear. *Ann N Y Acad Sci* 942:1-14.
- Rio C, Dikkes P, Liberman MC, Corfas G (2002) Glial fibrillary acidic protein expression and promoter activity in the inner ear of developing and adult mice. *J Comp Neurol* 442:156-162.
- Rivolta MN, Holley MC (1998) GATA3 is downregulated during hair cell differentiation in the mouse cochlea. *J Neurocytol* 27:637-647.
- Robledo RF, Lufkin T (2006) Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are required for specification of the mammalian vestibular apparatus. *Genesis* 44:425-437.
- Roehm PC, Hansen MR (2005) Strategies to preserve or regenerate spiral ganglion neurons. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 13:294-300.
- Roh J, Cho EA, Seong I, Limb JK, Lee S, Han SJ, Kim J (2006) Down-regulation of Sox10 with specific small interfering RNA promotes transdifferentiation of Schwannoma cells into myofibroblasts. *Differentiation* 74:542-551.
- Romand R, Zine AE, Hafidi A (1993) Ontogenesis of F-actin in hair cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 25:213-222.
- Rossel M, Capocchi MR (1999) Mice mutant for both Hoxa1 and Hoxb1 show extensive remodeling of the hindbrain and defects in craniofacial development. *Development* 126:5027-5040.

- Royet J, Finkelstein R (1995) Pattern formation in *Drosophila* head development: the role of the orthodenticle homeobox gene. *Development* 121:3561-3572.
- Rubel EW (1978) Ontogeny of structure and function in the vertebrate auditory system. In: *Handbook of Sensory Physiology* (M.Jacobson, ed), pp 135-237. Berlin: Springer.
- Rubel EW, Fritsch B (2002) Auditory system development: Primary auditory neurons and their targets. *Annual Review of Neuroscience* 25:51-101.
- Ruben RJ (1967) Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 220 Suppl.:1-44.
- Ruel J, Wang J, Rebillard G, Eybalin M, Lloyd R, Pujol R, Puel JL (2007) Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex. *Hear Res* 227:19-27.
- Sage C, Huang M, Karimi K, Gutierrez G, Vollrath MA, Zhang DS, Garcia-Anoveros J, Hinds PW, Corwin JT, Corey DP, Chen ZY (2005) Proliferation of functional hair cells in vivo in the absence of the retinoblastoma protein. *Science* 307:1114-1118.
- Sage C, Huang M, Vollrath MA, Brown MC, Hinds PW, Corey DP, Vetter DE, Chen ZY (2006) Essential role of retinoblastoma protein in mammalian hair cell development and hearing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7345-7350.
- Sage CL, Marcus DC (2001) Immunolocalization of ClC-K chloride channel in strial marginal cells and vestibular dark cells. *Hear Res* 160:1-9.
- Saint-Germain N, Lee YH, Zhang Y, Sargent TD, Saint-Jeannet JP (2004) Specification of the otic placode depends on Sox9 function in *Xenopus*. *Development* 131:1755-1763.
- 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.
- Savarirayan R, Robertson SP, Bankier A, Rogers JG (2003) Variable expression of campomelic dysplasia in a father and his 46, XY daughter. *Pediatr Pathol Mol Med* 22:37-46.
- Schepers GE, Bullejos M, Hosking BM, Koopman P (2000) Cloning and characterisation of the Sry-related transcription factor gene Sox8. *Nucleic Acids Res* 28:1473-1480.
- Schimmang T (2007) Expression and functions of FGF ligands during early otic development. *Int J Dev Biol* 51:473-481.
- Schlierf B, Ludwig A, Klenovsek K, Wegner M (2002) Cooperative binding of Sox10 to DNA: requirements and consequences. *Nucleic Acids Res* 30:5509-5516.
- Schrott A, Melichar I, Popelar J, Syka J (1990) Deterioration of hearing function in mice with neural crest defect. *Hear Res* 46:1-7.
- Shah KN, Dalal SJ, Desai MP, Sheth PN, Joshi NC, Ambani LM (1981) White forelock, pigmentary disorder of irides, and long segment Hirschsprung disease: possible variant of Waardenburg syndrome. *J Pediatr* 99:432-435.
- Sheldahl LC, Park M, Malbon CC, Moon RT (1999) Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol* 9:695-698.
- Sher AE (1971) The embryonic and postnatal development of the inner ear of the mouse. *Acta Otolaryngol Suppl* 285:1-77.
- Sherr CJ, Roberts JM (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9:1149-1163.
- Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501-1512.
- Shibata T, Hibino H, Doi K, Suzuki T, Hisa Y, Kurachi Y (2006) Gastric type H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the cochlear lateral wall is critically involved in formation of the endocochlear potential. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:C1038-C1048.
- 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.
- Shima Y, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Chisaka O, Takeichi M, Uemura T (2002) Differential expression of the seven-pass transmembrane cadherin genes *Celsr1-3* and distribution of the *Celsr2* protein during mouse development. *Dev Dyn* 223:321-332.
- Shoji F, Yamasoba T, Magal E, Dolan DF, Altschuler RA, Miller JM (2000) Glial cell line-derived neurotrophic factor has a dose dependent influence on noise-induced hearing loss in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 142:41-55.
- Simpson P, Carteret C (1990) Proneural clusters: equivalence groups in the epithelium of *Drosophila*. *Development* 110:927-932.
- Smalley MJ, Dale TC (1999) Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 18:215-230.
- Smith JM, Koopman PA (2004) The ins and outs of transcriptional control: nucleocytoplasmic shuttling in development and disease. *Trends Genet* 20:4-8.

- Sobkowicz HM, August BK, Slapnick SM (1997) Cellular interactions as a response to injury in the organ of Corti in culture. *Int J Dev Neurosci* 15:463-485.
- Sock E, Schmidt K, Hermanns-Borgmeyer I, Bosl MR, Wegner M (2001) Idiopathic weight reduction in mice deficient in the high-mobility-group transcription factor Sox8. *Mol Cell Biol* 21:6951-6959.
- Sonnenberg-Riethmacher E, Miede M, Stolt CC, Goerich DE, Wegner M, Riethmacher D (2001) Development and degeneration of dorsal root ganglia in the absence of the HMG-domain transcription factor Sox10. *Mech Dev* 109:253-265.
- Southard-Smith EM, Angrist M, Ellison JS, Agarwala R, Baxevasis AD, Chakravarti A, Pavan WJ (1999) The Sox10(Dom) mouse: modeling the genetic variation of Waardenburg-Shah (WS4) syndrome. *Genome Res* 9:215-225.
- Southard-Smith EM, Kos L, Pavan WJ (1998) Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat Genet* 18:60-64.
- Spoendlin H (1971) Primary structural changes in the organ of Corti after acoustic overstimulation. *Acta Otolaryngol* 71:166-176.
- Staecker H, Kopke R, Malgrange B, Lefebvre P, Van De Water TR (1996) NT-3 and/or BDNF therapy prevents loss of auditory neurons following loss of hair cells. *Neuroreport* 7:889-894.
- Stanchina L, Baral V, Robert F, Pingault V, Lemort N, Pachnis V, Goossens M, Bondurand N (2006) Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development. *Dev Biol* 295:232-249.
- Stankovic K, Rio C, Xia A, Sugawara M, Adams JC, Liberman MC, Corfas G (2004) Survival of adult spiral ganglion neurons requires erbB receptor signaling in the inner ear. *J Neurosci* 24:8651-8661.
- Steel KP, Barkway C (1989) Another role for melanocytes: their importance for normal stria vascularis development in the mammalian inner ear. *Development* 107:453-463.
- Steel KP, Kros CJ (2001) A genetic approach to understanding auditory function. *Nat Genet* 27:143-149.
- Steel KP, Smith RJ (1992) Normal hearing in Splotch (Sp/+), the mouse homologue of Waardenburg syndrome type 1. *Nat Genet* 2:75-79.
- Stolt CC, Lommes P, Friedrich RP, Wegner M (2004) Transcription factors Sox8 and Sox10 perform non-equivalent roles during oligodendrocyte development despite functional redundancy. *Development* 131:2349-2358.
- Stolt CC, Rehberg S, Ader M, Lommes P, Riethmacher D, Schachner M, Bartsch U, Wegner M (2002) Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes Dev* 16:165-170.
- Stolt CC, Schmitt S, Lommes P, Sock E, Wegner M (2005) Impact of transcription factor Sox8 on oligodendrocyte specification in the mouse embryonic spinal cord. *Dev Biol* 281:309-317.
- Stone LS (1931) Induction of the ear by the medulla and its relation to experiments of the lateralis system in amphibia. *Science* 74:577.
- Strutt D (2003) Frizzled signalling and cell polarisation in Drosophila and vertebrates. *Development* 130:4501-4513.
- Strutt D, Johnson R, Cooper K, Bray S (2002) Asymmetric localization of frizzled and the determination of notch-dependent cell fate in the Drosophila eye. *Curr Biol* 12:813-824.
- Strutt H, Price MA, Strutt D (2006) Planar polarity is positively regulated by casein kinase Iepsilon in Drosophila. *Curr Biol* 16:1329-1336.
- Strutt H, Strutt D (2005) Long-range coordination of planar polarity in Drosophila. *Bioessays* 27:1218-1227.
- Sudbeck P, Scherer G (1997) Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *J Biol Chem* 272:27848-27852.
- Suzuki M, Yamasoba T, Kaga K (1998) Development of the blood-labyrinth barrier in the rat. *Hear Res* 116:107-112.
- Swanson GJ, Howard M, Lewis J (1990) Epithelial autonomy in the development of the inner ear of a bird embryo. *Dev Biol* 137:243-257.
- Tachibana M (1999) Sound needs sound melanocytes to be heard. *Pigment Cell Res* 12:344-354.
- Tachibana M (2001) Cochlear melanocytes and MITF signaling. *J Invest Dermatol Symp Proc* 6:95-98.
- Tachibana M, Kobayashi Y, Matsushima Y (2003) Mouse models for four types of Waardenburg syndrome. *Pigment Cell Res* 16:448-454.
- Takamatsu N, Kanda H, Tsuchiya I, Yamada S, Ito M, Kabeno S, Shiba T, Yamashita S (1995) A gene that is related to SRY and is expressed in the testes encodes a leucine zipper-containing protein. *Mol Cell Biol* 15:3759-3766.
- Takasaki K, Balaban CD, Sando I (2000) Histopathologic findings of the inner ears with Alport, Usher and Waardenburg syndromes. *Adv Otorhinolaryngol* 56:218-232.

- 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.
- Takeuchi S, Ando M (1998) Dye-coupling of melanocytes with endothelial cells and pericytes in the cochlea of gerbils. *Cell Tissue Res* 293:271-275.
- Takeuchi S, Ando M, Sato T, Kakigi A (2001) Three-dimensional and ultrastructural relationships between intermediate cells and capillaries in the gerbil stria vascularis. *Hear Res* 155:103-112.
- Tasaki I, Spyropoulos CS (1959) Stria vascularis as source of endocochlear potential. *J Neurophysiol* 22:149-155.
- Taylor KM, Labonne C (2005) SoxE factors function equivalently during neural crest and inner ear development and their activity is regulated by SUMOylation. *Dev Cell* 9:593-603.
- Terao E, Janssens S, van den Bosch de Aguilar, Portier M, Klosen P (2000) In vivo expression of the intermediate filament peripherin in rat motoneurons: modulation by inhibitory and stimulatory signals. *Neuroscience* 101:679-688.
- Teubner B, Michel V, Pesch J, Lautermann J, Cohen-Salmon M, Sohl G, Jahnke K, Winterhager E, Herberhold C, Hardelin JP, Petit C, Willecke K (2003) Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum Mol Genet* 12:13-21.
- Thierry JP (1967) Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J Microsc* 6:987-1018.
- Thompson MA, Ziff EB (1989) Structure of the gene encoding peripherin, an NGF-regulated neuronal-specific type III intermediate filament protein. *Neuron* 2:1043-1053.
- Tian Y, James S, Zuo J, Fritsch B, Beisel KW (2006) Conditional and inducible gene recombineering in the mouse inner ear. *Brain Res* 1091:243-254.
- Torres M, Giraldez F (1998) The development of the vertebrate inner ear. *Mech Dev* 71:5-21.
- Torres M, Gomez-Pardo E, Gruss P (1996) Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development* 122:3381-3391.
- Touraine RL, ttie-Bitach T, Manceau E, Korsch E, Sarda P, Pingault V, Encha-Razavi F, Pelet A, Auge J, Nivelon-Chevallier A, Holschneider AM, Munnes M, Doerfler W, Goossens M, Munnich A, Vekemans M, Lyonnet S (2000) Neurological phenotype in Waardenburg syndrome type 4 correlates with novel SOX10 truncating mutations and expression in developing brain. *Am J Hum Genet* 66:1496-1503.
- Tran BH (2002) Endolymphatic deafness: a particular variety of cochlear disorder. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 64:120-124.
- Tree DR, Ma D, Axelrod JD (2002a) A three-tiered mechanism for regulation of planar cell polarity. *Semin Cell Dev Biol* 13:217-224.
- Tree DR, Shulman JM, Rousset R, Scott MP, Gubb D, Axelrod JD (2002b) Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling. *Cell* 109:371-381.
- Troy CM, Brown K, Greene LA, Shelanski ML (1990) Ontogeny of the neuronal intermediate filament protein, peripherin, in the mouse embryo. *Neuroscience* 36:217-237.
- Tsai H, Hardisty RE, Rhodes C, Kiernan AE, Roby P, Tymowska-Lalanne Z, Mburu P, Rastan S, Hunter AJ, Brown SD, Steel KP (2001) The mouse slalom mutant demonstrates a role for Jagged1 in neuroepithelial patterning in the organ of Corti. *Hum Mol Genet* 10:507-512.
- Tsukita S, Furuse M (2002) Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr Opin Cell Biol* 14:531-536.
- Tsuprun V, Santi P (1997) Ultrastructural organization of proteoglycans and fibrillar matrix of the tectorial membrane. *Hear Res* 110:107-118.
- van de Wetering M., Clevers H (1992) Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix. *EMBO J* 11:3039-3044.
- van de Wetering M., Oosterwegel M, van NK, Clevers H (1993) Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *EMBO J* 12:3847-3854.
- Van Laer L., Coucke P, Mueller RF, Caethoven G, Flothmann K, Prasad SD, Chamberlin GP, Houseman M, Taylor GR, Van de Heyning CM, Fransen E, Rowland J, Cucci RA, Smith RJ, Van CG (2001) A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet* 38:515-518.
- Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT (2003) A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 5:367-377.

- Vega JA, San J, I, Cabo R, Rodriguez S, Represa J (1999) Trks and p75 genes are differentially expressed in the inner ear of human embryos. What may Trks and p75 null mutant mice suggest on human development? *Neurosci Lett* 272:103-106.
- Vendrell V, Carnicero E, Giraldez F, Alonso MT, Schimmang T (2000) Induction of inner ear fate by FGF3. *Development* 127:2011-2019.
- Vetter DE, Mann JR, Wangemann P, Liu J, McLaughlin KJ, Lesage F, Marcus DC, Lazdunski M, Heinemann SF, Barhanin J (1996) Inner ear defects induced by null mutation of the *isk* gene. *Neuron* 17:1251-1264.
- Von Bekesy (1960) *Experiments in Hearing*. New York: McGraw-Hill.
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantés J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, . (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79:1111-1120.
- Wallis D, Hamblen M, Zhou Y, Venken KJ, Schumacher A, Grimes HL, Zoghbi HY, Orkin SH, Bellen HJ (2003) The zinc finger transcription factor Gfi1, implicated in lymphomagenesis, is required for inner ear hair cell differentiation and survival. *Development* 130:221-232.
- Wang J, Mark S, Zhang X, Qian D, Yoo SJ, Radde-Gallwitz K, Zhang Y, Lin X, Collazo A, Wynshaw-Boris A, Chen P (2005) Regulation of polarized extension and planar cell polarity in the cochlea by the vertebrate PCP pathway. *Nat Genet* 37:980-985.
- Wang W, Chan EK, Baron S, Van De WT, Lufkin T (2001a) Hmx2 homeobox gene control of murine vestibular morphogenesis. *Development* 128:5017-5029.
- Wang W, Grimmer JF, Van De Water TR, Lufkin T (2004) Hmx2 and Hmx3 homeobox genes direct development of the murine inner ear and hypothalamus and can be functionally replaced by *Drosophila* Hmx. *Dev Cell* 7:439-453.
- Wang Y, Guo N, Nathans J (2006a) The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. *J Neurosci* 26:2147-2156.
- Wang Y, Huso D, Cahill H, Ryugo D, Nathans J (2001b) Progressive cerebellar, auditory, and esophageal dysfunction caused by targeted disruption of the *frizzled-4* gene. *J Neurosci* 21:4761-4771.
- Wang Y, Liu H, Shen Y, Wang Z, Li H (2006b) Peripherin as a marker for degeneration of spiral ganglion neurons after aminoglycoside ototoxicity. *Acta Otolaryngol* 126:1128-1133.
- Wangemann P (2006) Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *J Physiol* 576:11-21.
- Watanabe K, Takeda K, Katori Y, Ikeda K, Oshima T, Yasumoto K, Saito H, Takasaka T, Shibahara S (2000) Expression of the Sox10 gene during mouse inner ear development. *Brain Res Mol Brain Res* 84:141-145.
- Wegner M (1999) From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 27:1409-1420.
- Wegner M (2001) Expression of transcription factors during oligodendroglial development. *Microsc Res Tech* 52:746-752.
- Wegner M (2005) Secrets to a healthy Sox life: lessons for melanocytes. *Pigment Cell Res* 18:74-85.
- Wehrle-Haller B (2003) The role of Kit-ligand in melanocyte development and epidermal homeostasis. *Pigment Cell Res* 16:287-296.
- Weibel ER (1957) [Differentiation processes in the epithelium of ductus cochlearis.]. *Acta Anat (Basel)* 29:53-90.
- Wendling O, Chambon P, Mark M (1999) Retinoid X receptors are essential for early mouse development and placentogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:547-551.
- White FA, Silos-Santiago I, Molliver DC, Nishimura M, Phillips H, Barbacid M, Snider WD (1996) Synchronous onset of NGF and TrkA survival dependence in developing dorsal root ganglia. *J Neurosci* 16:4662-4672.
- White PM, Doetzlhofer A, Lee YS, Groves AK, Segil N (2006) Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells. *Nature* 441:984-987.
- Whitfield T, Haddon C, Lewis J (1997) Intercellular signals and cell-fate choices in the developing inner ear: origins of global and of fine-grained pattern. *Semin Cell Dev Biol* 8:239-247.
- Wiechers B, Gestwa G, Mack A, Carroll P, Zenner HP, Knipper M (1999) A changing pattern of brain-derived neurotrophic factor expression correlates with the rearrangement of fibers during cochlear development of rats and mice. *J Neurosci* 19:3033-3042.
- Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Riazuddin S, Friedman TB (2001) Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 104:165-172.
- Wilkinson DG, Peters G, Dickson C, McMahon AP (1988) Expression of the FGF-related proto-oncogene *int-2* during gastrulation and neurulation in the mouse. *EMBO J* 7:691-695.

- Willis D, Li KW, Zheng JQ, Chang JH, Smit A, Kelly T, Merianda TT, Sylvester J, van MJ, Twiss JL (2005) Differential transport and local translation of cytoskeletal, injury-response, and neurodegeneration protein mRNAs in axons. *J Neurosci* 25:778-791.
- Wilson M, Koopman P (2002) Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr Opin Genet Dev* 12:441-446.
- Wodarz A, Nusse R (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:59-88.
- Wolpowitz D, Mason TB, Dietrich P, Mendelsohn M, Talmage DA, Role LW (2000) Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* 25:79-91.
- Woods C, Montcouquiol M, Kelley MW (2004) Math1 regulates development of the sensory epithelium in the mammalian cochlea. *Nat Neurosci* 7:1310-1318.
- Wright DE, Snider WD (1995) Neurotrophin receptor mRNA expression defines distinct populations of neurons in rat dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 351:329-338.
- Wright TJ, Mansour SL (2003) Fgf3 and Fgf10 are required for mouse otic placode induction. *Development* 130:3379-3390.
- Xiang M, Gao WQ, Hasson T, Shin JJ (1998) Requirement for Brn-3c in maturation and survival, but not in fate determination of inner ear hair cells. *Development* 125:3935-3946.
- Xiang M, Maklad A, Pirvola U, Fritsch B (2003) Brn3c null mutant mice show long-term, incomplete retention of some afferent inner ear innervation. *BMC Neurosci* 4:2.
- Xin H, Pramanik R, Choubey D (2003) Retinoblastoma (Rb) protein upregulates expression of the Ifi202 gene encoding an interferon-inducible negative regulator of cell growth. *Oncogene* 22:4775-4785.
- Xu PX, Adams J, Peters H, Brown MC, Heaney S, Maas R (1999) Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nat Genet* 23:113-117.
- Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ, Zoghbi HY (2001) Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* 294:2155-2158.
- Yoshida N, Liberman MC (1999) Stereociliary anomaly in the guinea pig: effects of hair bundle rotation on cochlear sensitivity. *Hear Res* 131:29-38.
- Zelarayan LC, Vendrell V, Alvarez Y, Dominguez-Frutos E, Theil T, Alonso MT, Maconochie M, Schimmang T (2007) Differential requirements for FGF3, FGF8 and FGF10 during inner ear development. *Dev Biol* 308:379-391.
- Zha XM, Bishop JF, Hansen MR, Victoria L, Abbas PJ, Mouradian MM, Green SH (2001) BDNF synthesis in spiral ganglion neurons is constitutive and CREB-dependent. *Hear Res* 156:53-68.
- 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.
- Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, de CB (1997) Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn* 209:377-386.
- Zheng JL, Gao WQ (2000) Overexpression of Math1 induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears. *Nat Neurosci* 3:580-586.
- Zheng JL, Helbig C, Gao WQ (1997) Induction of cell proliferation by fibroblast and insulin-like growth factors in pure rat inner ear epithelial cell cultures. *J Neurosci* 17:216-226.
- Zhu L, Skoultschi AI (2001) Coordinating cell proliferation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 11:91-97.
- Zine A, Romand R (1996) Development of the auditory receptors of the rat: a SEM study. *Brain Res* 721:49-58.
- Zine A, Van De Water TR, de Ribaupierre F (2000) Notch signaling regulates the pattern of auditory hair cell differentiation in mammals. *Development* 127:3373-3383.
- Zou D, Silvius D, Rodrigo-Blomqvist S, Enerback S, Xu PX (2006) Eya1 regulates the growth of otic epithelium and interacts with Pax2 during the development of all sensory areas in the inner ear. *Dev Biol* 298:430-441.