



*Faculté des Sciences
Service de Biologie Cellulaire et Tissulaire
Prof. M. Thiry*

Etude morphologique et immunocytologique du développement prénatal de l'organe de Corti chez le rat.

Mémoire présenté par

Nicolas Thelen

*En vue de l'obtention du D.E.A. en
Sciences, orientation Biologie
Animale*

Année académique 2005-2006



*Faculté des Sciences
Service de Biologie Cellulaire et Tissulaire
Prof. M. Thiry*

Etude morphologique et immunocytologique du développement prénatal de l'organe de Corti chez le rat.

Mémoire présenté par

Nicolas Thelen

*En vue de l'obtention du D.E.A. en
Sciences, orientation Biologie
Animale*

Année académique 2005-2006

A l'occasion de ce Mémoire, qu'il nous soit permis d'exprimer toute notre gratitude au Professeur Marc Thiry. Son accueil, son enthousiasme, ses conseils et ses critiques judicieuses nous ont permis de réaliser ce travail dans des conditions optimales.

Qu'il nous soit également permis de remercier le Docteur Brigitte Malgrange dont la précision chirurgicale lors des dissections ainsi les conseils éclairés nous auront été plus qu'indispensables.

La réalisation de ce mémoire aurait été impossible sans l'aide de Mademoiselle Francine Skivée. Celle-ci nous a dispensé sans compter son temps précieux, ses idées, ses connaissances et une aide technique primordiale. Son enthousiasme nous a également accompagné tout au long de ce travail. Qu'elle en soit remerciée.

Nos plus vifs remerciements vont également à Madame Patricia Ernst pour sa présence, sa patience et ses conseils lors des dissections.

Nous remercions également Ingrid Breuskin, Morgan Bodson, Renaud Vandebosch et Arlette Broze sans qui l'utilisation du cryostat et du microscope confocal se serait révélée fort compliquée.

A Marie parce qu'elle a toujours été là,

à Earl Grey car il est un bien meilleur compagnon nocturne que Douwe Egberts.

1.INTRODUCTION GENERALE.....	1
1.1. INTRODUCTION	2
1.2. STRUCTURE DU CANAL COCHLÉAIRE	2
1.3. STRUCTURE DE L'ORGANE DE CORTI	5
1.3.1. Cellules piliers et espaces intercellulaires.....	5
1.3.2. Cellules de soutien	6
1.3.3. Cellules sensorielles.....	6
1.3.4. Cellules et structures adjacentes à l'organe de Corti	8
1.3.5. Innervation de l'organe de Corti.....	9
1.4. DÉVELOPPEMENT MORPHOLOGIQUE DE L'ORGANE DE CORTI	10
1.4.1. Développement du canal cochléaire	10
1.4.2. Développement de l'organe de Corti.....	11
1.4.3. Quelques marqueurs spécifiques des cellules de l'organe de Corti	12
1.4.3.1. p27.....	12
1.4.3.2. Math1.....	12
1.4.3.5. Myosines VI et VIIa.....	12
1.4.3.3. Facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs)	13
1.4.3.4. p75 ^{NGFR}	13
1.4.3.5. S100A1.....	13
1.4.4. Développement de l'innervation de l'organe de Corti.....	14
1.5. OBJECTIFS	16
2.MATÉRIELS ET MÉTHODES	17
2.1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE	18
2.2. PRÉLÈVEMENT DES COCHLÉES ET DE L'ORGANE DE CORTI	18
2.3. PRÉPARATIONS DES COCHLÉES ET DES ORGANES DE CORTI POUR L'OBSERVATION MICROSCOPIQUE	18
2.3.1. Préparation des organes de Corti pour l'observation aux microscopes photonique et électronique à transmission.....	18
2.3.1.1. Enchâssement dans une résine époxy.....	18
2.3.1.2. Enchâssement dans une résine acrylique.....	19
2.3.2. Préparation des cochlées pour l'observation au microscope confocal à balayage laser	19
2.4. IMMUNOHISTOCHEMIE	20
2.4.1. Mise en évidence des polysaccharides sur les coupes semifines et ultrafines par la méthode à l'acide périodique-thiocarbohydrazide-protéinate d'argent (Thiéry, 1967)	20
2.4.2. Immunomarquages.....	20
2.4.2.1. Immunomarquages sur cryosections	20
2.4.2.1.1. Anticorps primaires	21
2.4.2.1.2. Anticorps secondaires.....	21
2.4.2.2. Immunomarquages sur coupes ultrafines	21
2.5. OBSERVATION DES COCHLÉES ET DES ORGANES DE CORTI	22
2.5.1. Observations des cryosections au microscope confocal à balayage laser	22
2.5.2. Observations des coupes semifines au microscope photonique	22
2.5.3. Observations des coupes ultrafines au microscope électronique à transmission.....	23

3. RÉSULTATS.....	24
3.1. MISE EN ÉVIDENCE DES POLYSACCHARIDES PAR LA MÉTHODE À L'ACIDE PÉRIODIQUE-THIOCARBOHYDRAZIDE-PROTÉINATE D'ARGENT (THIÉRY, 1967).	25
3.1.1. <i>Embryons de rat à 16 jours</i>	25
3.1.2. <i>Embryons de rat à 17 jours</i>	25
3.1.3. <i>Embryons de rat à 18 jours</i>	31
3.1.4. <i>Embryons de rat à 19 jours</i>	31
3.2. IMMUNOMARQUAGES	33
3.2.1. <i>Embryons de rat à 16 jours</i>	33
3.2.2. <i>Embryons de rat à 17 jours</i>	33
3.2.3. <i>Embryons de rat à 18 jours</i>	35
3.2.4. <i>Embryons de rat à 19 jours</i>	35
4.DISCUSSION GÉNÉRALE	42
4.1. DISCUSSION GÉNÉRALE	43
6. BIBLIOGRAPHIE	45

Liste des abréviations et des symboles

°C : degré centigrade

μm : micromètre

Å : angström

b* : cellule bordante

CO₂ : dioxyde de carbone

d* : cellule de Deiter

DMEM : Dubbelco's Modified Eagle Medium

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

GER : 'greater epithelial ridge', grande crête épithéliale

h* : cellule de Hensen

i* : cellule sensorielle interne

IHC : 'inner hair cell', cellule sensorielle interne

LER : 'lesser epithelial ridge', petite crête épithéliale

mM, M : milli-, molaire

o* : cellule sensorielle externe

OHC : 'outer hair cell', cellule sensorielle externe

p* : cellule pilier

PBS : 'phosphate buffer saline', tampon phosphate salin

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

RER : réticulum endoplasmique rugueux

s* : cellule de soutien interne

t* : cellule tectale

u* : cellule sous-tectale

v* : vaisseau spiral

Gs : ganglion spiral

(* : abréviations et symboles utilisés pour annoter les microphotographies tout au long de ce travail)

1.INTRODUCTION GENERALE

1.1. Introduction

Chez les mammifères, plus de 7 millions de photorécepteurs sont nécessaires à une bonne perception visuelle. Environ 6 millions de cônes et un million de bâtonnets sont en effet contenus dans leur rétine. Tout aussi efficace, l'organe de l'audition ne comporte qu'environ 15000 cellules réceptrices des sons. Cet organe, qui porte le nom de celui qui l'a décrit pour la première fois à la moitié du XIX^{ème} siècle (Alfonso Corti, 1851), se situe dans le canal cochléaire au sein de l'oreille interne des mammifères, et son arrangement cellulaire hautement ordonné en fait sans doute l'une des plus remarquables structures connues chez les vertébrés supérieurs.

Hormis le nombre total de cellules composant l'organe de Corti ainsi que le temps nécessaire à la maturation de ce dernier, il est également remarquable de constater à quel point sa structure et son arrangement cellulaire semblent similaires entre les différentes espèces de mammifères euthériens (Pujol et al., 1998). La plupart des études effectuées ont été pratiquées sur la souris (Ruben, 1967 ; Sher, 1971), mais aussi sur d'autres rongeurs comme le cochon d'Inde (Pujol and Hilding, 1973 ; Thorn, 1975), le hamster (Kaltenbach and Falzarano, 1994), le lapin (Morita et al., 1996 ; Nakai and Hilding, 1968), la gerbille (Arjmand et al., 1988 ; Spicer and Schulte, 1994) et le rat (Abdouh et al., 1994 ; Lenoir et al., 1980 ; Malgrange et al., 2002 ; Mu et al., 1997 ; Pirvola et al., 1990 ; Zine and Romand, 1996). D'autres analyses ont été réalisées sur la chauve-souris (Vater et al., 1997) ou encore sur le chat et sur le chien (Pujol and Hilding, 1973) et cette liste n'est pas exhaustive. Toutefois, si on connaît de façon satisfaisante sa structure à l'état mature, peu de renseignements existent sur son développement morphologique, les données concernant ce dernier restent parcellaires et de nombreuses zones d'ombres restent à éclaircir.

1.2. Structure du canal cochléaire

L'oreille interne des mammifères comprend une portion osseuse, le labyrinthe osseux, qui engaine une portion membraneuse, le labyrinthe membraneux. Des cavités irrégulières emplies de périlymphe les séparent. L'endolymphe occupe la cavité du labyrinthe membraneux. Ce dernier, de même que le labyrinthe osseux, comporte 3 parties : le vestibule, les canaux semi-circulaires et le limaçon ou cochlée (Figure 1.). Les canaux semi-circulaires, au nombre de 3, s'insèrent en arrière du vestibule. Le limaçon s'en détache en avant. Le vestibule et les canaux semi-circulaires font partie de l'organe de l'équilibre.

La cochlée, structure hélicoïdale enroulée autour d'un axe central nommé columelle ou *modiolus* est formée par 3 canaux : le canal cochléaire, la rampe vestibulaire et la rampe tympanique (Figure 2A). Ces deux derniers canaux sont en communication par une ouverture appelée l'hélicotrème. L'organe auditif proprement dit est représenté par l'organe de Corti. Il occupe la partie médiane de la membrane basilaire qui représente la partie externe du plancher du canal cochléaire (Figure 2B). Le canal cochléaire est rempli par de l'endolymphe qui se

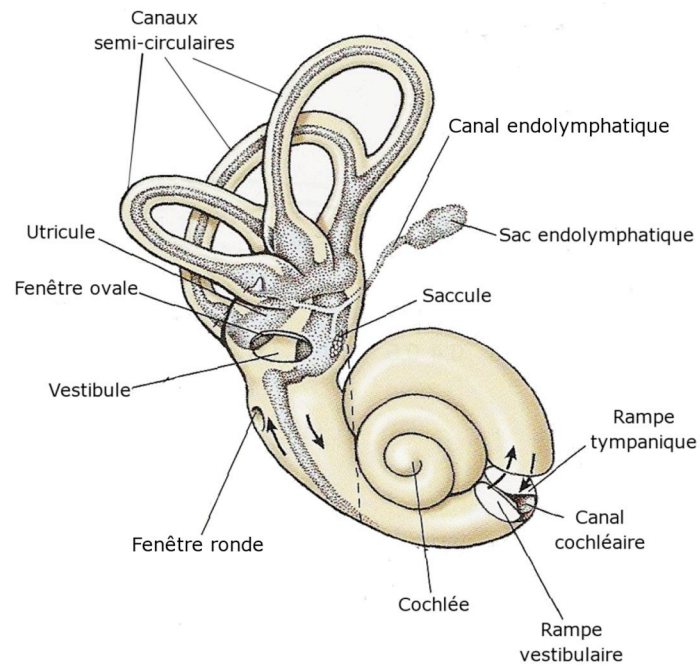


Figure 1. Représentation schématique de l'oreille interne des mammifères. Repris de Randall D., Burggren W., French K. 1997. *Eckert Animal Physiology, mechanisms and adaptations*. 4th ed. W.H. Freeman and Compagny. New York.

1. INTRODUCTION GENERALE

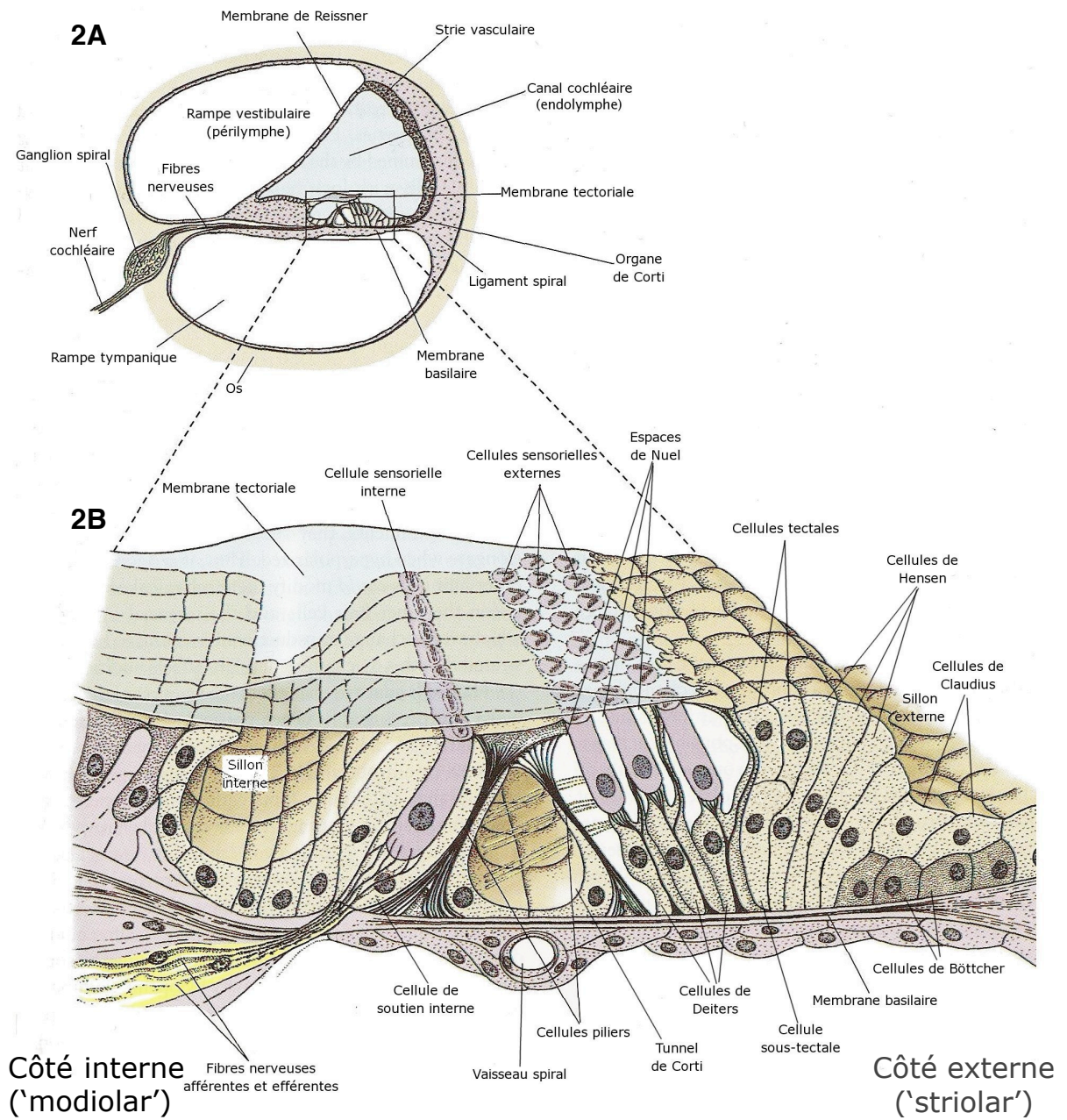


Figure 2. Représentation schématique en A du canal cochléaire et en B de l'organe de Corti. Repris et modifié de Randall D., Burggren W., French K. 1997. *Eckert Animal Physiology, mechanisms and adaptations*. 4th ed. W.H. Freeman and Compagny. New York.

différencie le liquide extracellulaire par une concentration plus haute en ions K^+ (approximativement 150 mM dans l'oreille humaine) et une plus basse en ions Na^+ (approximativement 1 mM dans l'oreille humaine). Les 2 autres canaux de la cochlée, la rampe vestibulaire et la rampe tympanique, baignent dans le périlymphe qui se distingue de l'endolymphe par une concentration plus basse en ions K^+ (approximativement 7 mM dans l'oreille humaine) et une plus haute en ions Na^+ (approximativement 140 mM dans l'oreille humaine). La membrane basilaire sépare la rampe tympanique du canal cochléaire et ce dernier est séparé de la rampe vestibulaire par la membrane de Reissner.

1.3. Structure de l'organe de Corti

L'organe de Corti est une structure complexe constituée par 2 types cellulaires principaux : les cellules sensorielles et des cellules de soutien. Nous distinguons parmi ces 2 grandes classes 4 sortes de cellules de soutien : les cellules piliers internes et externes, les cellules de soutien internes (cellules phalangeaires) et les cellules de soutien externes (cellules de Deiters), et 2 types de cellules sensorielles : les cellules sensorielles internes et externes, responsables de la détection des sons. Toutes ces cellules se distribuent suivant un arrangement précis qui se retrouve sur toute la longueur de l'organe, adoptant une régularité rarement atteinte chez les vertébrés (Figure 2B). Toutefois, Raphael et Altschuler (2003) ont signalé des différences morphologiques établies selon un gradient base-apex.

1.3.1. Cellules piliers et espaces intercellulaires

Le tunnel de Corti apparaît en coupe transversale comme un espace intercellulaire de forme triangulaire bordé par les cellules piliers. Il représente en quelque sorte l'axe de l'organe de Corti où se définissent la partie interne vers la columelle et la partie externe vers la strie vasculaire.

Les cellules piliers sont des cellules de soutien spécialisées qui, sur la membrane basale, recouvrent le plancher du tunnel de Corti. Leur noyau est en position basale et elles se prolongent par une fine extension cytoplasmique légèrement dilatée à leur pôle apical. Leur caractéristique cytoplasmique essentielle est la présence sur toute leur longueur d'un assemblage organisé de tonofilaments et de microtubules (Raphael et Altschuler, 2003). De fins ponts transversaux unissent les filaments d'actine et les microtubules qui, au niveau de la tête et de la base des cellules piliers, s'épanouissent en éventail. Ce cytosquelette organisé confère aux cellules piliers une rigidité exceptionnelle. Les cellules piliers internes sont nombreuses (environ 6000). En contact étroit les unes avec les autres sur toute la hauteur, elles forment un mur continu séparant le tunnel de Corti de la partie interne de l'organe. Les cellules piliers internes et externes ne se touchent que par leurs extrémités. La tête de chaque cellule pilier externe vient s'encaster sous celle de la cellule pilier interne. Quant aux cellules piliers externes (au nombre d'approximativement 4000), seuls leurs niveaux apical

et basal sont en contact, constituant sur la paroi externe du tunnel de Corti de véritables arcades par lesquelles le tunnel communique largement avec les espaces de Nuel.

Les espaces de Nuel sont de vastes espaces intercellulaires qui entourent les cellules sensorielles externes et qui communiquent donc avec le tunnel de Corti. Tous ces espaces intercommunicants sont remplis d'un fluide possédant les mêmes caractéristiques que la périlymphe c'est-à-dire une concentration relativement haute en ions Na^+ et basse en ions K^+ (Raphael and Altschuler, 2003) et sont fermés à la surface de l'organe de Corti par des expansions des cellules piliers et des cellules de Deiters.

1.3.2. Cellules de soutien

Les cellules de Deiters sont de véritables cellules de soutien pour les cellules sensorielles externes. Le cytoplasme de ces cellules contient un abondant réticulum endoplasmique rugueux et leur corps se termine à l'apex par une cupule où viendront se loger le pôle basal d'une cellule sensorielle externe et les terminaisons nerveuses correspondantes. De la cupule part dans les espaces de Nuel un prolongement filiforme isolé d'un diamètre d'environ $3\text{ }\mu\text{m}$ pour une longueur de $30\text{ }\mu\text{m}$. Ce prolongement correspond à un assemblage organisé de filaments d'actine et de microtubules identique à celui des cellules piliers ; il se termine par une phalange aplatie surmontée d'une touffe de microvillosités.

Dans la partie interne, on retrouve les cellules de soutien internes (cellules phalangeaires) qui supportent les cellules sensorielles internes. Ces cellules de soutien internes séparent les cellules sensorielles internes d'entre elles et des cellules piliers internes.

1.3.3. Cellules sensorielles

Les cellules sensorielles internes (aussi appelées cellules ciliées internes ; 'inner hair cells', IHC), au nombre d'approximativement 3500, sont piriformes et réparties sur une seule rangée. Leur pôle apical forme une table épaissie, la plaque cuticulaire, de laquelle émergent deux rangées de stéréocils baignant dans l'endolymphe et formant une courbe très ouverte à concavité tournée en dedans vers l'axe de la cochlée (fig 3.). Les stéréocils sont des projections de la membrane plasmique dont le support mécanique est assuré par des microfilaments d'actine (Raphael et Altschuler, 2003 ; Zine et al., 1995). La longueur des stéréocils varie d'une espèce à l'autre et selon un gradient base-apex ; elle dépend de la fréquence des ondes sonores détectées par leur organe de l'audition (Pujol et al., 1998). La membrane plasmique des faces latérales est doublée par une couche de réticulum endoplasmique lisse. Au contact du pôle basal viennent se terminer des fibres nerveuses afférentes et efférentes. En regard des premières, les plus nombreuses, on observe de nombreuses vésicules

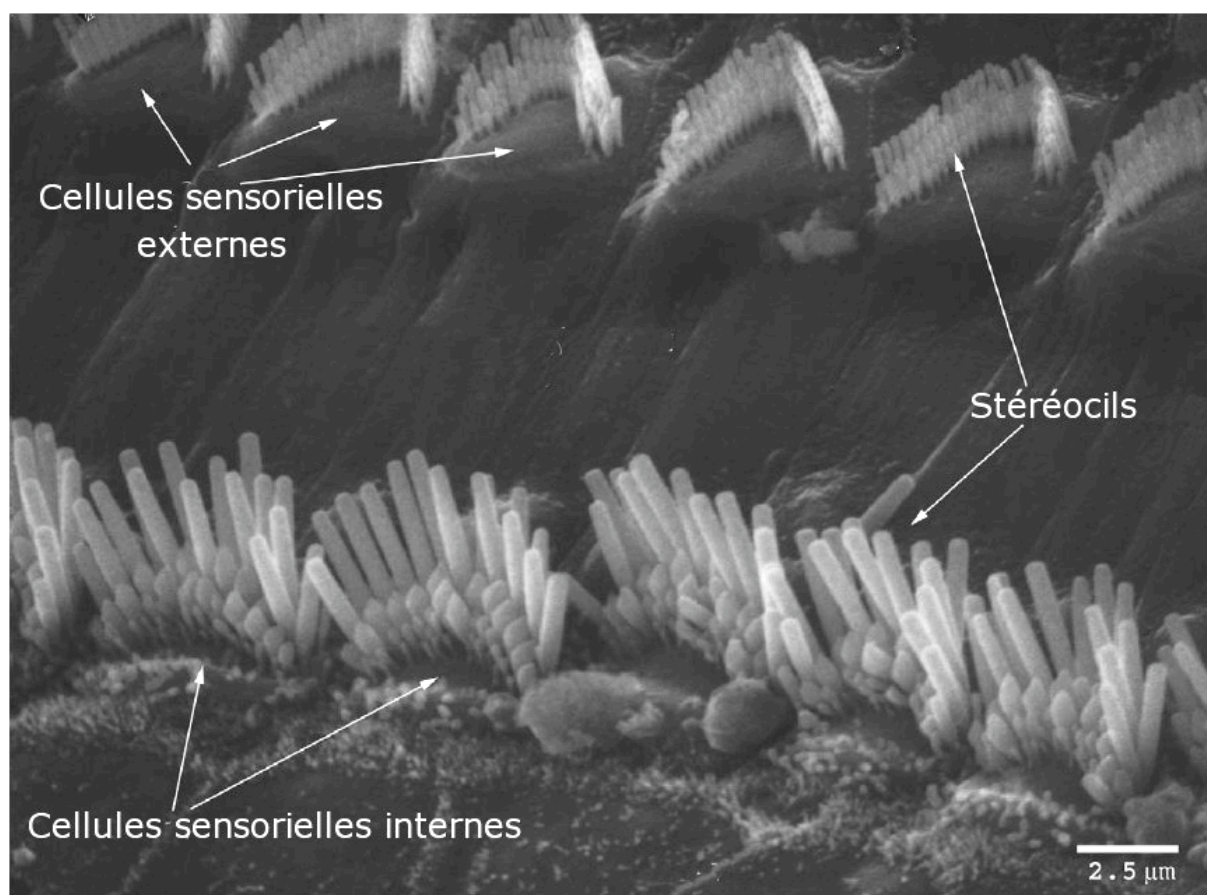


Figure 3. Face apicale des cellules sensorielles internes et externes vues en microscopie électronique à balayage. Repris de Raphael Y. and Altschuler R.A., 2003.

synaptiques souvent liées à des rubans synaptiques. Au contact des faces internes des IHC, on trouve les cellules bordantes caractérisées par de nombreuses microvillosités à leur surface apicale.

Les cellules sensorielles externes (aussi appelées cellules ciliées externes ; 'outer hair cells', OHC) sont réparties sur 3 rangées et sont donc plus nombreuses que les IHC (approximativement 12000). Elles sont de forme cylindrique et présentent dans l'ensemble les mêmes caractéristiques que les IHC. Elles possèdent 3 ou 4 rangées de stéréocils disposés en W ouvert, à pointe externe (Figure 3.). Leur réticulum endoplasmique lisse sous-membranaire est particulièrement développé, formant plusieurs couches.

Suivant l'espèce étudiée, il peut y avoir quelques variations dans le nombre de rangées de OHC dans la région apicale du canal cochléaire, parfois plus de 5. Des rangées supplémentaires de IHC sont rarement observées. Ces cas de figures restent toutefois rares (Kaltenbach and Falzarano, 1994 ; Lenoir et al., 1987).

1.3.4. Cellules et structures adjacentes à l'organe de Corti

De part et d'autre de l'organe de Corti, on trouve le sillon interne et le sillon externe. Le sillon interne est recouvert par un épithélium cubique ou aplati. Le sillon externe est composé de plusieurs types cellulaires distincts.

Les premières cellules bordant l'organe de Corti du côté externe sont les cellules tectales (Malgrange et al., 2002 ; Rueda et al., 1993) supportées par les cellules sous-tectales qui sont en contact avec la membrane basale (Malgrange et al., 2002).

A l'extérieur des cellules tectales et sous-tectales se trouvent les cellules de Hensen. Disposées sur quelques rangées, elles sont hautes et volumineuses et possèdent un noyau rond en position moyenne. Leur surface ne présente que quelques petites microvillosités.

On trouve ensuite des cellules de forme cubique, les cellules de Böttcher, recouvertes et séparées de la lumière du canal cochléaire par les cellules de Claudius également de forme cubique et au cytoplasme moins riche en organites que les cellules de Böttcher (Junqueira et al., 1995).

A l'extérieur du sillon externe se trouve la strie vasculaire composée de 3 couches cellulaires : les cellules marginales, les cellules intermédiaires et les cellules basales (Raphael and Altschuler, 2003). Seules les cellules marginales sont en contact avec la lumière du canal cochléaire.

La strie vasculaire joue un rôle important dans l'absorption et la sécrétion du liquide endolymphatique. Entre la strie vasculaire et la capsule otique se trouve le ligament spiral ; il contient de nombreux capillaires sanguins et joue un rôle mécanique dans le soutien de la strie vasculaire et de la membrane basilaire.

Le limbe spiral, situé à l'intérieur du sillon interne, est revêtu par un épithélium de cellules cylindriques qui ne forme de revêtement continu que dans leur zone apicale. Ces cellules possèdent une membrane apicale épaissie en contact avec la membrane tectoriale, un noyau en position centrale et un cytoplasme contenant une zone golgienne importante ; de nombreuses vésicules se constituent dans cette zone et semblent transférer le matériel sécrétoire par la membrane apicale dans la membrane tectoriale.

La membrane tectoriale est une structure fibreuse, gélatineuse et acellulaire (Junqueira et al., 1995) Sa partie externe repose sur le pôle apical des cellules de l'organe de Corti, mais il semble que seuls les stéréocils les plus longs des OHC lui soient liés. La membrane tectoriale est perforée de fins canalicules qui serviraient à la circulation de l'endolymphe.

Situé dans le plancher du canal cochléaire, le vaisseau spiral se trouve juste sous l'organe de Corti. Ce vaisseau sanguin constitue un excellent point de repère lors d'observations microscopiques.

1.3.5. Innervation de l'organe de Corti

Deux catégories de fibres nerveuses se terminent au niveau de l'organe de Corti : des fibres afférentes sensorielles et des fibres efférentes effectrices. Les premières, au nombre d'approximativement 50000 chez l'humain, correspondent à la terminaison dendritique des cellules bipolaires du ganglion spiral qui se trouve au sein de la columelle formée par la spirale de la cochlée. 45000 d'entre elles, issues des neurones de type I du ganglion spiral, se terminent au niveau des IHC, alors que les 5000 restantes, issues des neurones de type II du ganglion spiral, se ramifient pour innerver les OHC après avoir effectué un important trajet spiral dans le tunnel de Corti ou entre les cellules de Deiters. L'innervation varie quelque peu entre les espèces et le long de l'axe base-apex. (Ryugo, 1992 cité par Rubel and Fritzsch, 2002) Les fibres efférentes, au nombre d'approximativement 500 chez l'humain, se ramifient abondamment pour prendre contact avec de nombreuses cellules sensorielles tant internes que externes.

1.4. Développement morphologique de l'organe de Corti

1.4.1. Développement du canal cochléaire

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

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

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

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

Dans le canal cochléaire en formation, certaines cellules dégénèrent au cours du développement de l'oreille interne du rat à partir de E12 jusqu'à E16. Cette mort cellulaire augmente jusqu'à E14 parallèlement au renouvellement cellulaire décrit par Ruben (1967) au moment de l'observation des dernières mitoses puis diminue jusqu'à E16 (Marovitz et al., 1976). Chez la souris de E17,5 jusqu'à la naissance, cette dégénérescence cellulaire se focalise à des endroits

particuliers (Nishizaki et al., 1998). Notons que la durée de gestation est plus longue chez le rat que chez la souris : elle est en moyenne de 22 jours chez le rat et de 19 jours chez la souris.

1.4.2. Développement de l'organe de Corti

Chez la souris, sur base du nombre de couches cellulaires visibles, une distinction peut être faite à E16 entre deux crêtes cellulaires nommées la grande crête épithéliale (Greater Epithelial Ridge, GER) et la petite crête épithéliale (Lesser Epithelial Ridge, LER). Le GER représente plus ou moins les deux tiers de la face dorsale du canal cochléaire tandis que le LER en représente le tiers restant. Les cellules du GER se développeraient en sillon interne et en limbe spiral. Il a été suggéré que les cellules de soutien internes (cellules phalangeaires) et les IHC proviennent également du GER (Kelley and Bianchi, 2001). Les cellules du LER se développeraient en OHC, en cellules de Deiters et en sillon externe qui comprend les cellules tectales, les cellules sous-tectales, les cellules de Hensen et les cellules de Claudius (Kelley and Bianchi, 2001 ; Malgrange et al., 2002 ; Rueda et al., 1993). Les cellules piliers se formeraient entre les 2 crêtes.

Au cours du développement, la différenciation cellulaire s'opèrerait en une vague qui se déplacerait le long de l'axe neural ('modiolar')-abneural ('striolar'). Un gradient de différenciation existe également le long de l'axe base-apex. Toutefois, l'origine exacte de la différenciation reste sujet à controverse : certains auteurs la localisent à l'extrême base du canal cochléaire, dans la région du crochet (Kaltenbach and Falzarano, 1994) et d'autres la situent dans la partie médio-basale du canal cochléaire (Anniko, 1983 ; Bredbeg, 1968 ; Lim and Anniko, 1985 ; Roth and Bruns, 1992) avec pour conséquence l'établissement d'un gradient de différenciation supplémentaire se dirigeant vers la région du crochet.

Chez le rat, l'étude du développement des stéréocils par l'utilisation en microscopie à fluorescence de marqueurs tels que la phalloïdine, un marqueur des microfilaments d'actine, ainsi que par l'observation au microscope électronique à balayage, a permis de suggérer que les premières cellules qui présenteraient un signe de différenciation seraient les IHC à E18 (Romand et al., 1993 ; Zine and Romand, 1996). Sur base des mêmes travaux, les OHC ne commenceraient leur différenciation qu'à partir de E20.

Toujours chez le rat, la fin de la maturation du cytosquelette des stéréocils des cellules sensorielles serait atteinte vers le 11^{ème} jour post-natal (P11) d'abord par les OHC (Vago et al., 1996 dans Pujol et al., 1998). Leur longueur finale serait atteinte dès P12 (Roth and Bruns, 1992).

La forme de toutes les cellules sensorielles est initialement cylindrique avec un élargissement de la région basale résultant de la relative grande taille du noyau (Pujol et al., 1998). Au cours du développement, les IHC maintiennent cette morphologie piriforme tandis que l'élargissement basal disparaît chez les OHC. L'ouverture du tunnel de Corti commence peu après la naissance, à P0 chez le chat (Sato et al., 1999) et à P4 chez la gerbille (Ito et al., 1995). L'ouverture des

espaces de Nuel débute durant la même période. Chez la plupart des mammifères, l'organe de Corti ne serait vraiment mature que 10 à 14 jours après le début de la fonction auditive (Pujol and Hilding, 1973).

1.4.3. Quelques marqueurs spécifiques des cellules de l'organe de Corti

1.4.3.1. p27

p27^{kip1} est un inhibiteur de kinase cycline-dépendante faisant partie de la famille CIP/KIP. Chez la souris entre E12,5 et E14,5, une bande de cellules situées au sein de l'épithélium dorsal du canal cochléaire devient p27^{kip1} positive et ce, parallèlement ou précédant de peu la sortie de leur cycle cellulaire (Chen and Segil, 1999 ; Lee et al., 2006). Cette bande de cellules se trouve à l'endroit du futur organe de Corti et est appelée zone de non prolifération cellulaire (ZNPC). Au cours du développement, l'expression de p27^{kip1} dans les cellules sensorielles diminue. Par contre, elle sera maintenue dans les cellules de soutien. Dans les souris dont le gène codant pour p27 a été invalidé, l'activité mitotique dans l'organe de Corti est prolongée, ce qui aboutit à la production de cellules sensorielles et de cellules de soutiens surnuméraires (Chen and Segil, 1999 ; Lowenheim et al., 1999).

1.4.3.2. Math1

Math1, l'homologue du gène proneural atonal de la drosophile, est un facteur de transcription de la famille basic Loop-Helix-Loop (bHLH). Chez la souris, son expression au sein de l'épithélium dorsal du canal cochléaire commence vers E14,5. A ce stade, son expression est réduite à deux étroites bandes de cellules situées sur le bord interne de la ZNPC dans la région basale du canal cochléaire (Chen et al., 2002). L'expression de Math1 va se restreindre aux seules cellules sensorielles vers E15,5 dans la région basale du canal cochléaire (Chen et al., 2002 ; Woods et al., 2004)

1.4.3.5. Myosines VI et VIIa

Les myosines VI et VIIa sont des myosines non conventionnelles composées de trois domaines : un domaine moteur ou catalytique contenant des sites de fixation à l'actine et le site d'hydrolyse de l'ATP, un domaine régulateur et une partie carboxyterminale (ou queue) responsable de l'état d'oligomérisation des myosines. Les myosines VI et VIIa sont des marqueurs spécifiques des cellules sensorielles (Hasson et al., 1997). Elles sont essentiellement concentrées dans la plaque cuticulaire et dans les stéréocils des cellules sensorielles. La myosine VI a été décrite comme étant un des marqueurs de cellules sensorielles le plus précoce avec Math1 (Montcouquiol and Kelley, 2003).

1.4.3.3. Facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs)

Les FGFs et leurs récepteurs sont largement impliqués dans le développement de l'organe de Corti. Parmi les récepteurs aux FGFs, le FGFR3 est exprimé dans l'organe de Corti mature et en développement (Pirvola et al., 1995). Chez la souris, le FGFR3 est exprimé à partir de E16 dans la région des futures cellules sensorielles externes, des cellules piliers et des cellules de Deiters. A P0 l'expression de FGFR3 se restreint aux cellules piliers (Mueller et al., 2002 ; Peters et al., 1993). Les organes de Corti de souris invalidées pour FGFR3 ne développent pas de cellules piliers différenciées (Colvin et al., 1996). L'observation de l'organe de Corti de souris invalidées pour Spry2, un antagoniste de FGF8, montre des cellules piliers surnuméraires (Shim et al., 2005). Pirvola et al. (2002) montrent que chez la souris à E16,5 les IHC expriment FGF8. Il a donc été suggéré que FGF8 pourrait être un ligand spécifique à FGFR3 et qu'un gradient de FGF8 partant des IHC serait responsable de la différenciation des cellules piliers (Jacques et al., 2006 ; Pirvola et al., 2002).

1.4.3.4. p75^{NGFR}

p75^{ngfr} est un récepteur de basse affinité capable de lier toutes les neurotrophines (Sano et al., 2001). Des études montrent que p75^{ngfr} est un marqueur spécifique des cellules piliers chez les souris entre P0 et P3 (von Bartheld et al., 1991 ; Gestwa et al., 1999 ; Sano et al., 2001). Mueller et al. (2002) montrent que l'expression de p75^{ngfr} commencerait vers E15 et que cette expression ne serait pas limitée à la région où vont se développer les cellules piliers : les futures cellules de Hensen seraient légèrement p75^{ngfr} positives. Dans cette même étude, les auteurs soulignent également le fait que le nombre de cellules p75^{ngfr} positives à partir de E16 chez la souris serait supérieur au nombre final de cellules piliers (Mueller et al., 2002 ; Woods et al., 2004).

1.4.3.5. S100A1

Les 13 protéines de la famille S100 sont composées d'hétéro- ou d'homodimères de sous unités α et β . Ces protéines ont été décrites comme étant étroitement associées aux protéines du cytosquelette telles que l'actine et la tubuline (Donato, 1991). La protéine S100A1 a été décrite comme marqueur spécifique des IHC, des cellules de Deiters et des cellules phalangeaires internes (Woods et al., 2004).

1.4.4. Développement de l'innervation de l'organe de Corti

Les neurones du ganglion cochléo-vestibulaire sont formés dès E9 chez la souris (Ruben, 1967). Par la suite, le ganglion cochléo-vestibulaire se scinde en ganglion cochléaire (ganglion spiral) et en ganglion vestibulaire (Hemond and Morest, 1991a ; 1991b cité par Kelley and Bianchi, 2001). Les dernières mitoses des neurones du ganglion cochléaire se produisent suivant un gradient base-apex, ce qui correspond à l'inverse de ce qui a été décrit pour les cellules sensorielles (Ruben, 1967).

Peu après la formation du ganglion cochléaire, les neurones de ce dernier commencent à étendre leurs fibres dendritiques dans le canal cochléaire en développement. Chez la souris, les neurones de type I du ganglion spiral (92 à 94% des neurones afférents) forment les fibres afférentes qui pénètrent l'épithélium à environ E16 et innervent les IHC (Sobkowicz, 1992 cité par Kelley and Bianchi, 2001). Durant le développement embryonnaire, ces fibres se ramifient afin d'innervier plus d'une IHC ; mais dans l'organe de Corti mature, ces ramifications sont perdues et chaque fibre n'innerve qu'une seule IHC. Une IHC peut être innervée par plus d'une vingtaine de fibres afférentes. Les fibres des neurones de type II (6 à 8% des neurones afférents) s'étendent le long de la membrane basilaire dans le tunnel de Corti en formation avant d'atteindre la région sensorielle externe. Chacune de ces fibres peut se ramifier et innervier plus de 5 OHC se trouvant dans la région basale, médiane ou apicale (Figure 4) (Sobkowicz, 1992 cité par Kelley and Bianchi, 2001). Certaines ramifications peuvent disparaître dans l'organe de Corti mature et la longueur de ces fibres innervant les OHC peut atteindre 470 μm de longueur (Berglund and Ryugo, 1987).

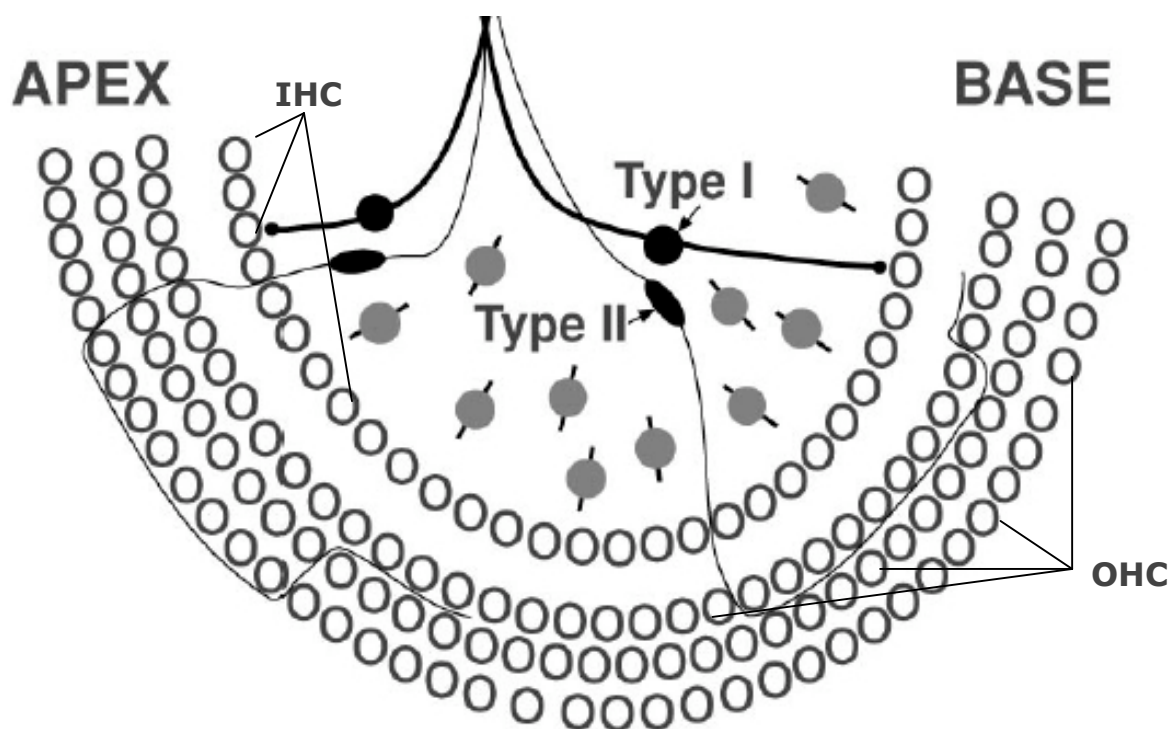


Figure 4. Représentation schématique de l'innervation afférente de l'organe de Corti. Repris de Rubel E.W. et Fritsch B., 2002. Les fibres des neurones de type I innervent chacune une seule IHC tandis que les fibres des neurones de type II innervent plusieurs OHC.

1.5. Objectifs

Comme mentionné plus haut dans l'introduction, si on peut considérer comme satisfaisante la connaissance de la morphologie de l'organe de Corti mature, des lacunes et des zones d'ombres subsistent quant au développement de cette remarquable structure. En effet, les données concernant ce dernier restent parcellaires et incomplètes.

Dans notre mémoire de licence, nous avons déjà effectué un premier pas vers une meilleure compréhension dans la mise en place des différents types cellulaires de l'organe de Corti. Rappelons brièvement nos principaux résultats :

- nous avons mis en évidence le caractère pseudo-stratifié de l'épithélium dorsal du canal cochléaire avant E18 ;
- nous croyons que la mise en place de l'organe de Corti est indépendante d'une prolifération cellulaire au site de sa formation mais parallèle à une multiplication dans le GER ;
- nous montrons que chez le rat, la différenciation de l'organe de Corti prend son origine dans la partie basale de la cochlée et qu'il existe un gradient de différenciation modiolar-striolar (interne-externe) ;
- nous pensons que les premières cellules différenciées qui apparaissent dans l'épithélium dorsal seraient typiques des cellules piliers. Observées en microscopie électronique à transmission, il s'avère que ces premières cellules possèdent dans leur cytoplasme un matériel typique des cellules piliers ;
- nous montrons qu'il est possible de reconnaître les IHC et les OHC dès E18.

A présent, nous allons tenter de confirmer et de préciser nos observations. Pour ce faire, nous allons utiliser différentes techniques immunocytologiques optiques et électroniques sur des coupes réalisées dans des cochlées entières ou dans des organes de Corti *in vivo* entre E16 et E19 chez le rat.

2.MATERIELS ET METHODES

2.1. Matériel biologique

Nous avons analysé des organes de Corti prélevés sur des embryons de rattes de type Wistar (fournies par l'animalerie centrale de l'Université de Liège) après différents temps de gestation. Le jour 0 de la gestation (E0) correspond au moment où une ratte est mise en présence d'un mâle. La mise à mâle dure 12 heures.

2.2. Prélèvement des cochlées et de l'organe de Corti

Les rattes gestantes et datées sont euthanasiées par placement dans une cloche où l'air est progressivement remplacé par du CO₂. Les embryons sont retirés de l'utérus et transférés dans une boîte de pétri contenant un tampon phosphate salin (PBS : 154mM NaCl ; 1mM KH₂PO₄ ; 3mM Na₂HPO₄ ; pH 7,2). Sous une loupe binoculaire, les cochlées sont retirées de la calvaria au moyen de pinces brucelles. Sur une partie des cochlées, les organes de Corti sont délicatement libérés des différents tissus qui les entourent.

2.3. Préparations des cochlées et des organes de Corti pour l'observation microscopique

2.3.1. Préparation des organes de Corti pour l'observation aux microscopes photonique et électronique à transmission

2.3.1.1. Enchâssement dans une résine époxy

Une fois prélevés, les organes de Corti sont directement plongés dans un liquide fixateur, du glutaraldéhyde dilué à une concentration de 2,5% dans un tampon phosphate de sodium 0,1M (pH 7,4). La fixation est réalisée à température ambiante pendant 60 minutes. Les organes de Corti sont ensuite rincés dans le tampon phosphate et y sont coupés en 3 parties de taille similaire : la base, la média et l'apex. Les fragments obtenus sont ensuite lavés dans de l'eau désionisée avant d'être déshydratés par passages successifs dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (70%, 95% et 100%). Les fragments sont ensuite imprégnés par de l'époxypropane pur, puis par des mélanges d'épon et d'époxypropane dans les proportions : 1/2, 1/1, 2/1 et durant une nuit dans un bain d'épon pur. Après enchâssement des fragments dans de l'épon vierge, la polymérisation de ce dernier est réalisée à une température de 60°C pendant 24 à 48 heures.

Des coupes semifines de 1µm d'épaisseur sont réalisées sur les blocs d'épon au moyen d'un couteau de diamant monté sur un ultratome à avance mécanique (Reichert Ultracut E). Des coupes ultrafines d'une épaisseur de 700Å sont réalisées sur les mêmes blocs que ceux qui ont servi à faire les coupes semifines. Toutefois, les coupes ultrafines sont recueillies sur des grilles d'or

recouvertes d'un film de collodion dilué à une concentration de 1% dans de l'isoamyle acétate.

2.3.1.2. Enchâssement dans une résine acrylique

Une fois prélevés, les organes de Corti sont directement plongés dans un liquide fixateur, du formaldéhyde dilué à une concentration de 2% dans un tampon phosphate de sodium 0,1M (pH 7,4). La fixation est réalisée à une température de 4°C pendant 30 minutes. Au cours des opérations qui suivent, la température est progressivement descendue à -30°C. Les organes de Corti sont ensuite rincés dans le tampon phosphate et y sont coupés en 3 parties de taille similaire : la base, la média et l'apex. Les fragments obtenus sont ensuite lavés dans de l'eau désionisée avant d'être déshydratés par passages successifs dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (70%, 95% et 100%). Les fragments sont ensuite enchâssés dans une résine hydrosoluble (Lowicryl K4M). La polymérisation de la résine est réalisée par une exposition aux UV à basse température et en absence d'oxygène.

Des coupes ultrafines d'une épaisseur de 700Å ont été réalisées au moyen d'un couteau de diamant monté sur un ultratome à avance mécanique (Reichert Ultracut E). Les coupes ultrafines sont ensuite recueillies sur des grilles de nickel recouvertes d'un film de collodion dilué à une concentration de 1% dans de l'isoamyle acétate.

2.3.2. Préparation des cochlées pour l'observation au microscope confocal à balayage laser

Une fois prélevées, les cochlées sont directement plongées dans un liquide fixateur, du formaldéhyde dilué à une concentration de 2% dans un tampon phosphate de sodium 0,1M (pH 7,4). La fixation est réalisée à température ambiante pendant 30 minutes. Les cochlées sont ensuite rincées dans le tampon phosphate avant d'être imprégnées pendant 10 minutes à 37°C par de la gélatine diluée à une concentration de 5% dans le tampon phosphate. Les cochlées sont ensuite ramenées progressivement à température ambiante et plongées dans 5 bains successifs d'une solution de saccharose concentré à 30% dans le tampon phosphate. Chacun des 5 bains dure 20 minutes et s'effectue à température ambiante. Les cochlées sont ensuite enrobées par du O.C.T. Compound (VWR International Ltd., Poole, England) et plongées dans un bain d'isopentane refroidi à une température de -70°C.

Des cryosections d'une épaisseur de 7 à 10µm sont réalisées sur les blocs de O.C.T. Compound congelés au moyen d'un cryostat (Leica CM 3050 S).

2.4. Immunohistochimie

2.4.1. Mise en évidence des polysaccharides sur les coupes semifines et ultrafines par la méthode à l'acide périodique-thiocarbohydrazide-protéinate d'argent (Thiéry, 1967)

Pendant 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité, les coupes semifines et ultrafines faites dans des blocs de matériel fixé par le glutaraldéhyde seul et enchâssé dans l'épon sont mises à flotter dans de l'acide périodique (Sigma, Bornem, Belgium) dilué à une concentration de 3% dans de l'eau désionisée. Elles sont ensuite rincées dans de l'eau désionisée. Les coupes sont ensuite déposées pendant 24 heures à l'obscurité sur une solution de thiocarbohydrazide (Merck, Overijse, Belgium) dilué à une concentration de 0,2% dans de l'acide acétique à 20% (UCB, Leuven, Belgium). Les coupes sont ensuite rincées par passages successifs dans des bains d'acide acétique de concentration décroissante (10%, 5% et 2,5%) avant d'être rincées dans de l'eau désionisée. Les coupes sont ensuite mises au contact pendant 60 minutes à l'obscurité à une solution de protéinate d'argent (Merck) dilué à une concentration de 1% dans de l'eau désionisée. Les coupes sont ensuite rincées dans de l'eau désionisée et déposées sur des grilles recouvertes d'un film support.

Des témoins ont été réalisés afin de tester la spécificité des marquages :

- Les coupes n'ont pas subi d'hydrolyse dans la solution d'acide périodique ;
- Les coupes ont évité le passage dans la solution de thiocarbohydrazide.
- Les coupes n'ont été que au contact de la solution de protéinate d'argent.

2.4.2. Immunomarquages

2.4.2.1. Immunomarquages sur cryosections

Les cryosections sont rincées dans un tampon phosphate salin (PBS : 140mM NaCl ; 2,6mM KCl ; 1,5mM KH₂PO₄ ; 16mM Na₂HPO₄ ; pH : 7,4). Elles sont ensuite rendues perméables avec une solution de Triton-X100 dilué à une concentration de 1% dans du PBS. Cette étape est réalisée à température ambiante pendant 10 minutes. Les cryosections sont ensuite rincées dans du PBS avant d'être plongées pendant 30 minutes à 37°C dans une solution bloquante de sérum normal de chèvre dilué à une concentration de 10% dans du PBS. Les cryosections sont ensuite immergées durant 35 minutes à 37°C dans une solution contenant du sérum normal de chèvre dilué à une concentration de 5% dans du PBS, ainsi que l'anticorps primaire (*Voir ci-après 4.2.1.1. Anticorps primaires*). Les cryosections sont ensuite rincées dans du PBS et immergées dans une solution contenant l'anticorps secondaire (*Voir ci-après 4.2.1.2. Anticorps secondaires*). Sur certaines coupes, des doubles marquages sont effectués. Dans ce cas, de la phalloïdine couplée au TRITC (1/1000 ; Sigma) est additionnée à la solution contenant l'anticorps secondaire. Les cryosections sont ensuite rincées dans du

PBS et montées entre lame et lamelle en présence de Citifluor (Laborimpex, Bruxelles, Belgium).

Les coupes témoins évitent le passage dans la solution contenant l'anticorps primaire.

2.4.2.1.1. Anticorps primaires

Les anticorps primaires et les dilutions utilisées sont les suivants :

- Anti-p27kip1 produit chez la souris ; 1/100 (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) ;
- Anti-Fgf8 produit chez la souris ; 1/100 (Sigma) ;
- Anti-S100A1 produit chez la souris ; 1/100 (Sigma) ;
- Anti-p75ngfr produit chez le lapin ; 1/50 (Chemicon International, Temecula, CA, USA) ;
- Anti-myosine VI produit chez le lapin ; 1/75 (Tama Hasson, University of California at San Diego, San Diego, CA, USA).

2.4.2.1.2. Anticorps secondaires

Les anticorps secondaires et les dilutions utilisées sont les suivants :

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

2.4.2.2. Immunomarquages sur coupes ultrafines

Les grilles supportant les coupes ultrafines effectuées sur les blocs de lowicryl sont mises à flotter sur du PBS (NaCl 0,14M ; NaH₂PO₄ 0,006M ; KH₂PO₄ 0,004M) 0,1M à pH 7,2 contenant 1% d'albumine de sérum bovin (BSA) (solution A) et du sérum normal de chèvre dilué 1/30 durant 30 minutes à la température du labo. Après un bref rinçage dans du PBS 0,1M pH 7,2 contenant 0,2% de BSA (solution B), les grilles sont mises à flotter pendant 4 heures à température du labo sur des gouttes de solution B contenant du sérum normal de chèvre dilué 1/50 et l'anticorps primaire anti-Fgf8 (Sigma) dilué au 1/50. Ce temps échu, les grilles sont rincées dans 4 bains de solution A puis 1 bain de PBS 0,1M pH 8,2 contenant 0,2% de BSA (solution C). Les grilles sont ensuite déposées sur des gouttes de solution C contenant l'anticorps secondaire anti-IgG de souris développé chez la chèvre et couplé à des particules d'or colloïdal de 5 nm de diamètre. Après 1h à température ambiante, les grilles sont rincées dans 4 bains de PBS 0,1M pH 8,2 contenant 1% BSA suivis de 4 bains d'eau désionisée. Les grilles sont ensuite mises à sécher.

Les coupes témoins évitent le passage dans la solution contenant l'anticorps primaire.

2.5. Observation des cochlées et des organes de Corti

2.5.1. Observations des cryosections au microscope confocal à balayage laser

Les cryosections sont observées au microscope confocal à balayage laser Biorad MRC 1024 monté sur un microscope inversé Zeiss Axiovert 135. Ce microscope est équipé d'un laser Krypton/Argon ainsi que d'une motorisation dans le plan Z qui permet la réalisation de plusieurs séries de sections optiques. La motorisation, le système de balayage du laser et la numérisation des images sont contrôlés par une station informatique. L'ensemble du processus d'acquisition est piloté via l'interface informatique LaserSharp 2000 5.2 build 824.

Pour l'observation des fluorochromes de type Alexa Fluor 488, toutes les lignes d'excitation du laser sont utilisées ; une combinaison des blocs filtres B1 (Beamsplitter) et T1 (Triple Dichroic) sont appliqués ; un filtre d'émission passe bande 522 DF 35 transmet les longueurs d'onde comprises entre 513 et 540 nm. Pour l'observation des fluorochromes de type Alexa Fluor 594 et TRITC, la ligne d'excitation du laser 568nm est utilisée ; un bloc filtre B1 est appliqué ainsi qu'un filtre d'émission passe-haut 585 EFLP qui minimise toutes les longueurs d'onde sous 585nm.

Les cryosections sont observées aux objectifs à immersion à huile 40x et 63x dont les ouvertures numériques sont respectivement de 1,3 et 1,4. Les sections optiques dans le plan Z sont collectées avec un pas de 0,10 μ m et une vitesse de balayage lente (3 secondes pour une image 512x512 pixels). Un filtrage Kalman d'amplitude 1 a été appliqué afin d'améliorer le rapport signal/bruit.

Les sections optiques sont analysées et traitées avec les logiciels ImageJ 1.34s (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) et The Gimp 2.2.10 (<http://www.gimp.org/>).

2.5.2. Observations des coupes semifines au microscope photonique

Les semifines sont observées au microscope photonique (Zeiss Axioplan) au contraste de phase avec l'objectif 40x ainsi qu'avec l'objectif 63x à immersion à huile.

2.5.3. Observations des coupes ultrafines au microscope électronique à transmission

Avant leur examen au microscope électronique à transmission, les coupes ultrafines sont contrastées pendant 5 minutes à l'acétate d'uranyle puis 5 minutes au citrate de plomb selon Reynolds (1963).

Les grilles sont examinées à l'aide d'un microscope électronique à transmission de type EM Jeol 100 CX II à la tension 60 KV.

3. RESULTATS

3.1. Mise en évidence des polysaccharides par la méthode à l'acide périodique-thiocarbohydrazide-protéinate d'argent (Thiéry, 1967).

Dans le but de mieux caractériser le matériel s'accumulant au niveau du cytoplasme supranucléaire des cellules piliers lors du développement prénatal, nous avons appliqué la méthode à l'acide périodique-thiocarbohydrazide-protéinate d'argent (Thiéry, 1967) sur des semifines dans la base de 12 organes de Corti prélevés chez des embryons de rat âgés de 16 à 19 jours. Ces semifines ont été observées et examinées à l'aide d'un microscope photonique. De plus, des analyses en microscopie électronique à transmission nous ont permis de compléter et/ou de préciser certaines observations obtenues sur les coupes semifines.

3.1.1. Embryons de rat à 16 jours

Sur les coupes semifines, dans la base du canal cochléaire d'embryons de rat E16, un organe de Corti reconnaissable n'est jamais observé. A ce stade, l'épithélium dorsal du canal cochléaire présente une dépression ; cette dépression est située dans le premier tiers interne de l'épithélium et à proximité du vaisseau spiral (Figure 5.).

Sur les coupes ultrafines, nous constatons qu'une seule cellule de l'épithélium dorsal du canal cochléaire présente des précipités d'argent dans son cytoplasme (Figure 6.). Cette cellule est située au niveau de la dépression de l'épithélium ; elle possède un grand noyau allongé en position basale et s'étend sur toute la hauteur de l'épithélium. Le pôle apical des cellules situées de part et d'autre de l'unique cellule marquée présente de nombreuses microvillosités. Seules 8 à 9 cellules localisées du côté externe de la cellule marquée possèdent des microvillosités (Figure 7.).

3.1.2. Embryons de rat à 17 jours

A E17, sur des semifines, dans la région basale du canal cochléaire, une seule cellule de l'épithélium dorsal du canal cochléaire présente de nombreux précipités d'argent dans son cytoplasme (Figure 8). Cette cellule est située au niveau de la dépression de l'épithélium déjà observée à E16 ; elle s'étend sur toute la hauteur de l'épithélium et possède un noyau proche de la membrane basale. A ce stade, aucun critère morphologique ne permet de distinguer avec certitude les différents types cellulaires de l'organe de Corti.

Sur des ultrafines, nous observons également de nombreux précipités d'argent dans le cytoplasme d'une cellule de l'épithélium dorsal du canal cochléaire. De plus, dans le cytoplasme supranucléaire de cette cellule, nous constatons la présence d'un appareil de Golgi particulièrement développé (Figure 9).

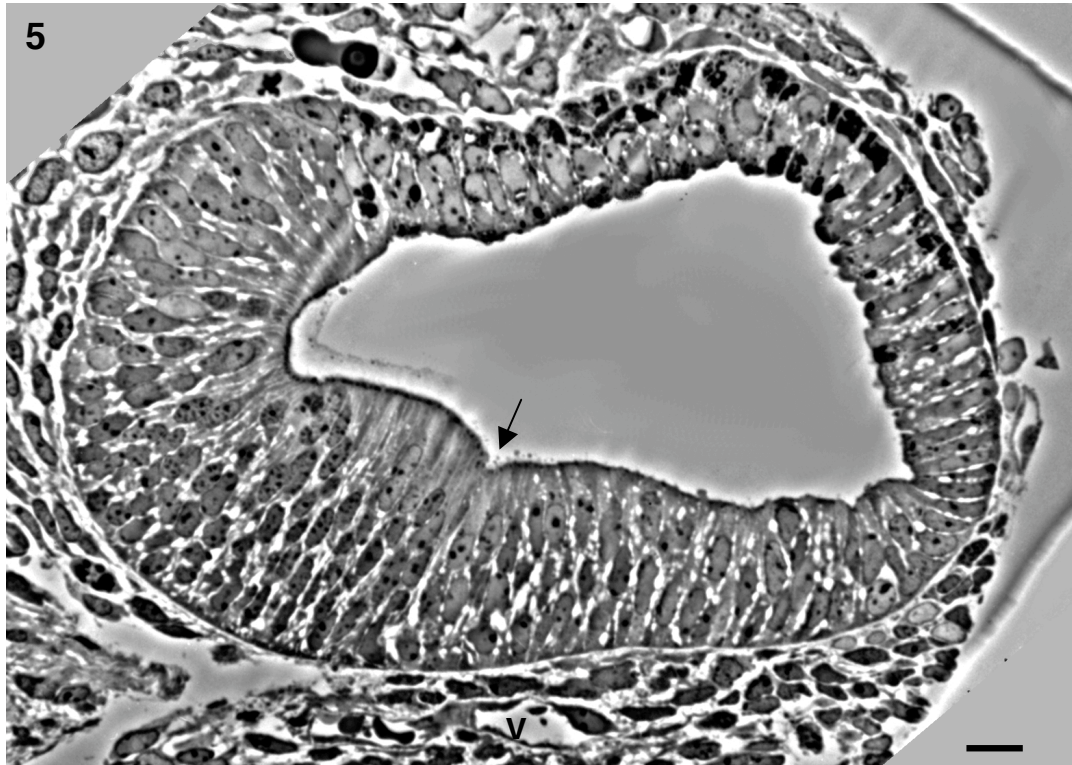


Figure 5. Mise en évidence des polysaccharides par méthode de Thiéry sur une coupe semifine dans la base du canal cochléaire au stade E16. La partie externe est située sur la droite de la figure et la partie interne sur la gauche. Flèche pleine : dépression de l'épithélium dorsal du canal cochléaire ; V : vaisseau spiral. Barre : 12 μ m.

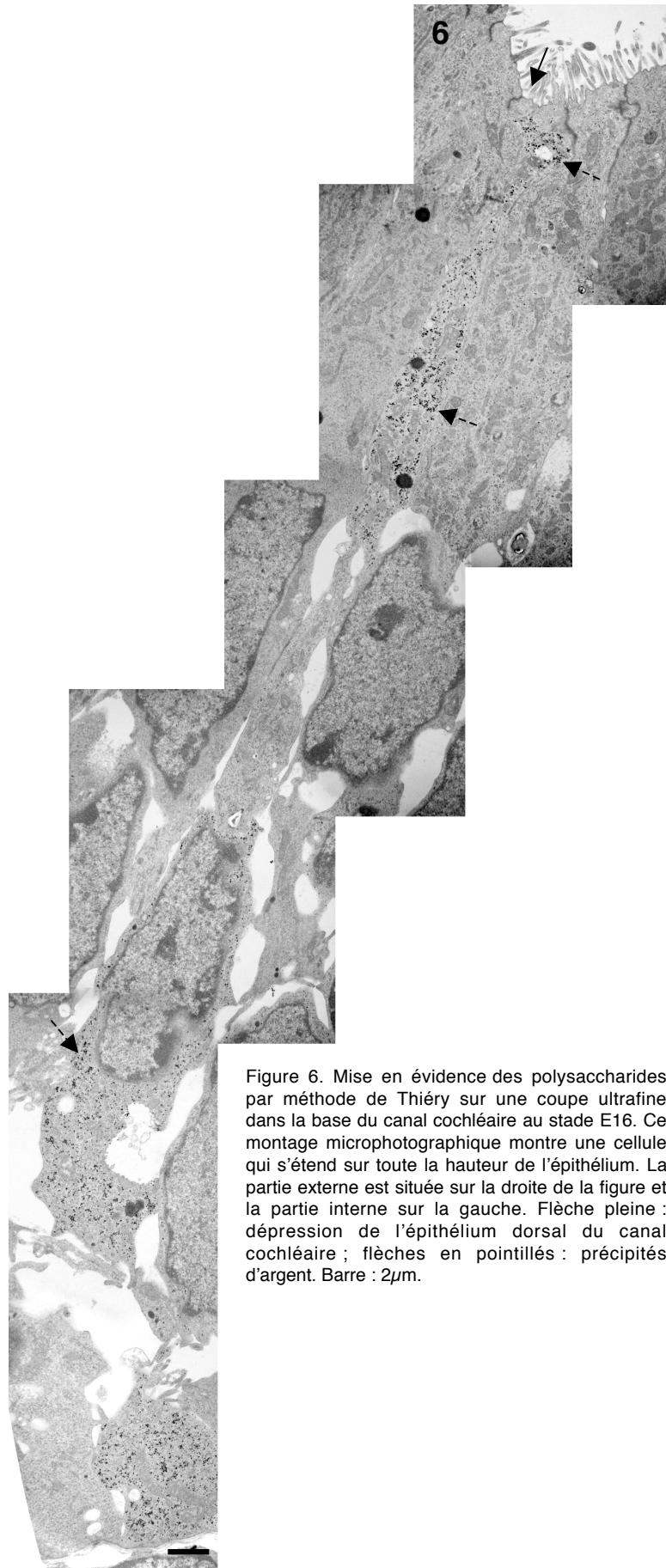


Figure 6. Mise en évidence des polysaccharides par méthode de Thiéry sur une coupe ultrafine dans la base du canal cochléaire au stade E16. Ce montage microphotographique montre une cellule qui s'étend sur toute la hauteur de l'épithélium. La partie externe est située sur la droite de la figure et la partie interne sur la gauche. Flèche pleine : dépression de l'épithélium dorsal du canal cochléaire ; flèches en pointillés : précipités d'argent. Barre : 2 μ m.

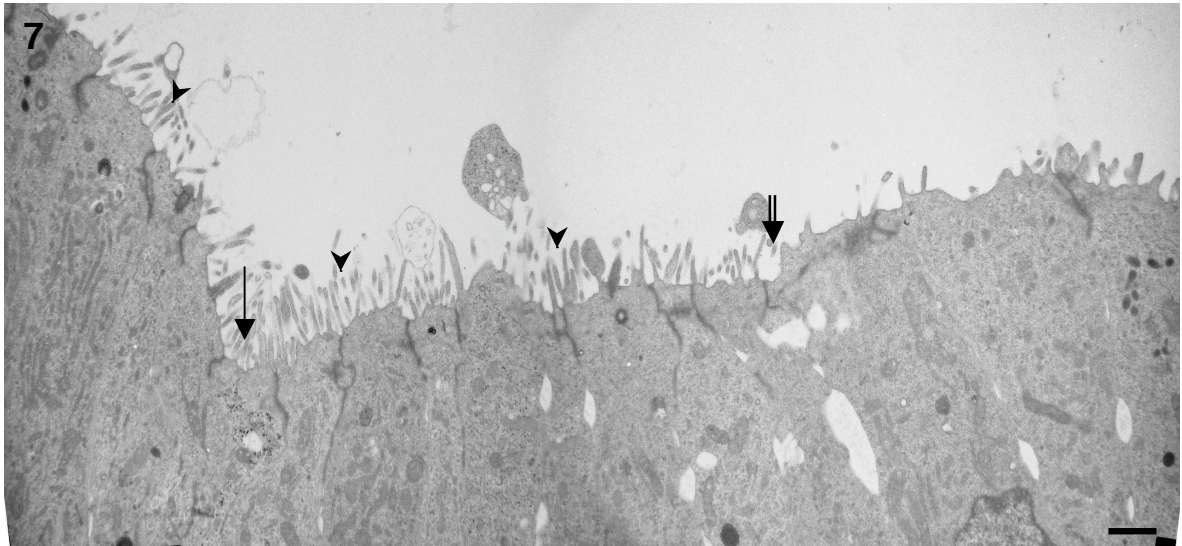


Figure 7. Mise en évidence des polysaccharides par méthode de Thiéry sur une coupe ultrafine dans la base du canal cochléaire au stade E16. Pôle apical des cellules de l'épithélium dorsal du canal cochléaire. La partie externe est située sur la droite de la figure et la partie interne sur la gauche. Flèche pleine : dépression de l'épithélium dorsal du canal cochléaire ; têtes de flèches : microvillosités ; double flèche : transition entre l'épithélium interne pourvu de nombreuses microvillosités et l'épithélium pauvre en extensions cytoplasmiques apicales. Barre : 2 μ m

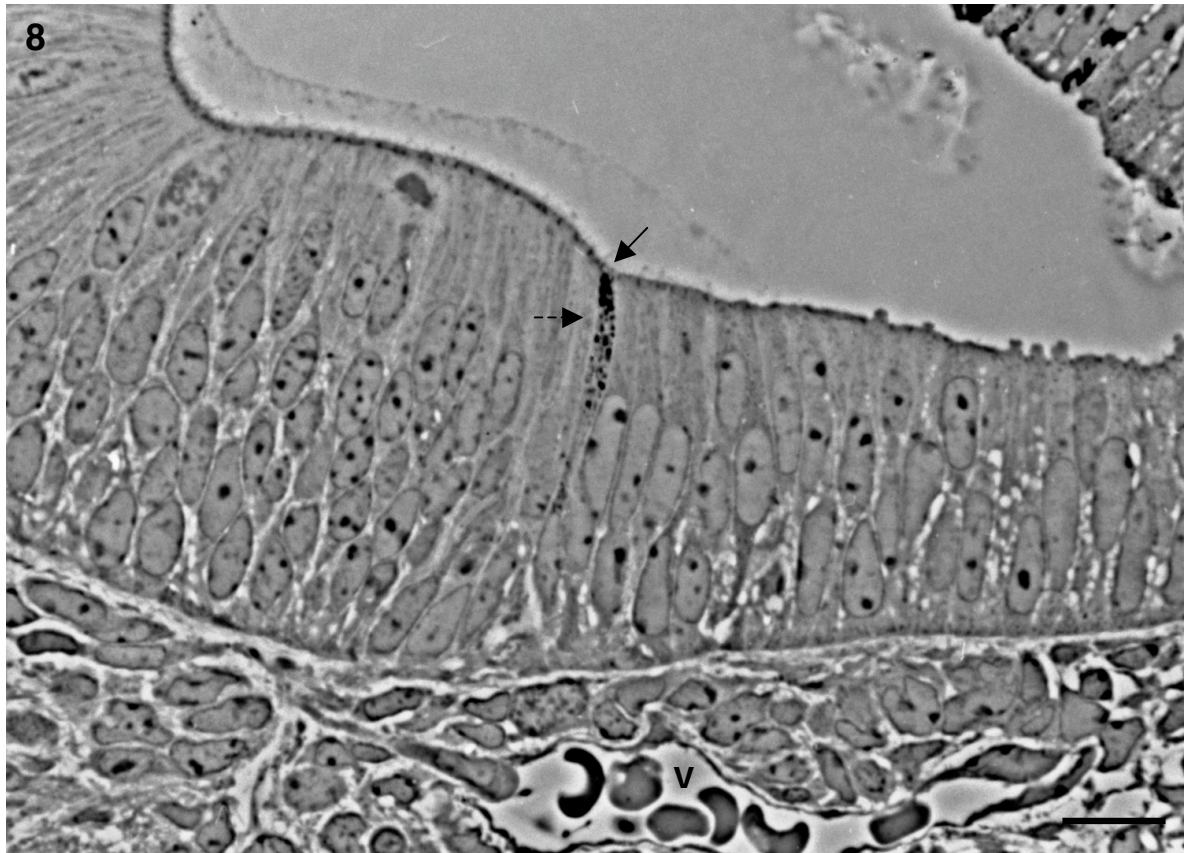


Figure 8. Mise en évidence des polysaccharides par méthode de Thiéry sur une coupe semifine dans la base du canal cochléaire au stade E17. La partie externe est située sur la droite de la figure et la partie interne sur la gauche. Flèche pleine : dépression de l'épithélium dorsal du canal cochléaire ; flèche en pointillés : précipités d'argent ; V : vaisseau spiral. Barre : 12 μ m.

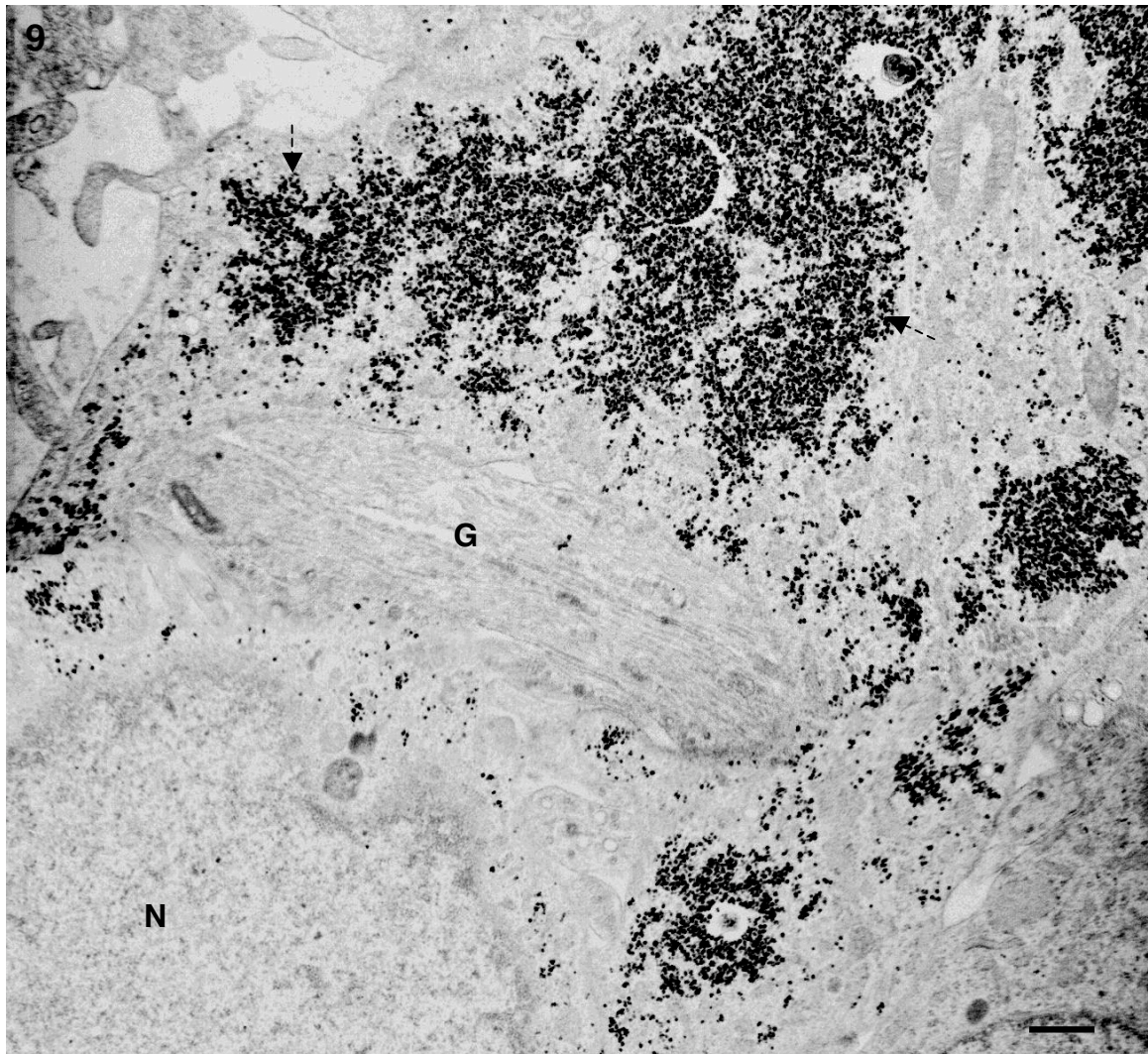


Figure 9. Mise en évidence des polysaccharides par méthode de Thiéry sur une coupe ultrafine dans la base du canal cochléaire au stade E17. Flèche en pointillés : précipités d'argent ; G : appareil de Golgi ; N : noyau. Barre : 0,5 μ m

3.1.3. Embryons de rat à 18 jours

Dans la région basale des canaux cochléaires chez des embryons de rat âgés de 18 jours, nous remarquons que, sur une grande majorité des coupes semifines, les différentes cellules de l'organe de Corti sont généralement reconnaissables. Nous constatons également que d'importants précipités d'argent sont présents dans le cytoplasme des cellules piliers (Figure 10A). Ce sont les seules cellules de l'épithélium dorsal du canal cochléaire à présenter ces précipités. Des observations identiques sont faites sur des ultrafines (données non illustrées).

3.1.4. Embryons de rat à 19 jours

Dans la région basale des canaux cochléaires prélevés sur des embryons de rat âgés de 19 jours, les différents types cellulaires de l'organe de Corti peuvent être facilement identifiés. Nous distinguons les cellules sensorielles internes (IHC) et les cellules sensorielles externes (OHC) mais également les diverses cellules de soutien : les cellules de Deiters, les cellules piliers interne et externe, les cellules phalangeaires et les cellules bordantes internes (Figure 10B).

Les précipités d'argent occupent plus de la moitié du cytoplasme des cellules piliers. Nous remarquons également que des précipités d'argent sont visibles dans les cellules de Hensen et dans une moindre mesure, également dans les cellules de Deiters (Figure 10B). Des observations identiques sont faites sur des ultrafines (données non illustrées).

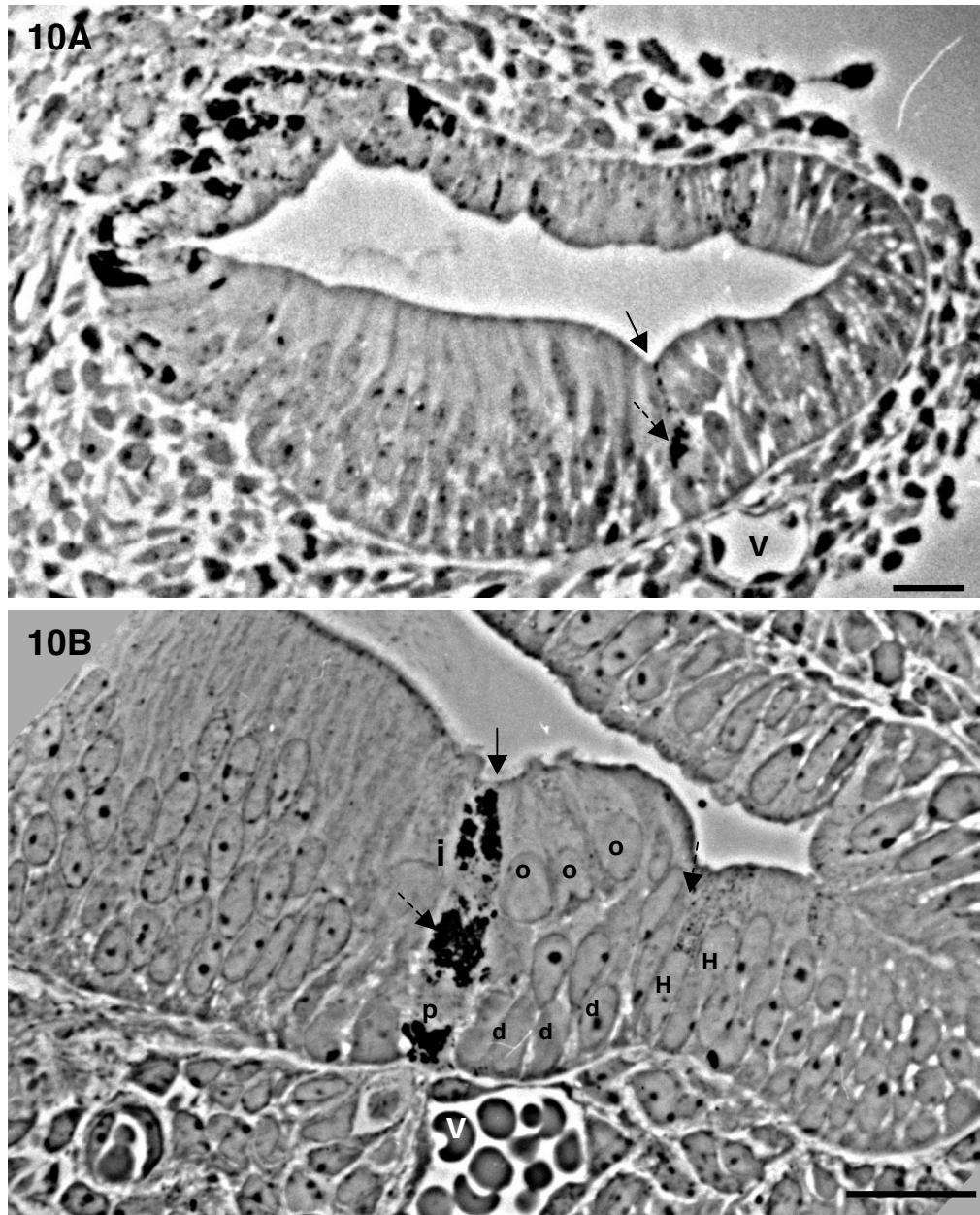


Figure 10. Mise en évidence des polysaccharides par méthode de Thiéry sur une coupe semifine dans la base du canal cochléaire au stade E18 (A) et E19 (B). La partie externe est située sur la droite de la figure et la partie interne sur la gauche. Flèche pleine : dépression de l'épithélium dorsal du canal cochléaire ; flèche en pointillés : précipités d'argent ; d : cellule de Deiters ; H : cellule de Hensen ; i : IHC ; o : OHC ; p : cellule pilier ; v : vaisseau spiral. Barre : 12 μ m.

3.2. Immunomarquages

Afin de mieux définir l'ordre d'apparition des différents types cellulaires au cours du développement de l'organe de Corti chez le rat, nous avons réalisé des immunomarquages sur des cryosections dans 46 cochlées entières d'embryons de rat âgés de 16 à 19 jours. Nous avons utilisé les anticorps anti-p27^{kip1}, anti-myosinVI, anti-p75^{ngfr}, anti-S100A1 et anti-FGF8. Pour identifier le site d'apparition des différentes cellules au sein soit du GER, soit du LER du canal cochléaire, nous avons également procédé ponctuellement à des doubles marquages avec la phalloïdine, une toxine présente dans un champignon (*Amanita phalloides*) et qui possède une grande affinité pour la F-actine. De plus, sur des ultrafines dans la base du canal cochléaire à E19, nous avons réalisé un marquage avec un anti-FGF8 et nous avons examiné le marquage obtenu à l'aide d'un microscope électronique à transmission. D'autres marquages ont été effectués au niveau ultrastructural, mais n'ont pas encore fourni de résultats probants.

3.2.1. Embryons de rat à 16 jours

Sur les cryosections marquées avec l'anti-p27^{kip1} et avec la phalloïdine, nous observons que dans la base du canal cochléaire, une partie des cellules de l'épithélium dorsal est p27^{kip1} positive (Figure 11A) ; aucune cellule p27^{kip1} positive n'est observée dans la partie la plus interne de l'épithélium. Nous constatons également que le pôle apical des cellules situées dans la partie interne de l'épithélium est marqué par la phalloïdine (Figure 11B). De plus, nous remarquons que seulement quelques cellules p27^{kip1} positives sont marquées par la phalloïdine au niveau de leur pôle apical (Figure 11C)

Nous n'observons aucune cellule de l'épithélium dorsal du canal cochléaire p75^{ngfr} positive. Par contre, nous constatons que les neurones du ganglion spiral sont p75^{ngfr} positifs (données non illustrées).

Sur les cryosections marquées avec l'anti-S100A1, nous remarquons que tout l'épithélium dorsal du canal cochléaire est S100A1 positif (données non illustrées). Par contre, sur les cryosections marquées avec l'anti-myosinVI, aucune cellule de l'épithélium dorsal n'est positive.

3.2.2. Embryons de rat à 17 jours

Nous constatons que dans la région basale du canal cochléaire, quelques cellules sont p75^{ngfr} positives. Ces cellules sont situées au sein de l'épithélium dorsal, à proximité du vaisseau spiral. Nous remarquons également que le ganglion spiral est également p75^{ngfr} positif (données non illustrées).

Comme nous l'avons observé à E16, l'épithélium dorsal du canal cochléaire est S100A1 positif. Par contre, nous n'observons aucune cellule positive sur les cryosections marquées avec l'anti-myosinVI.

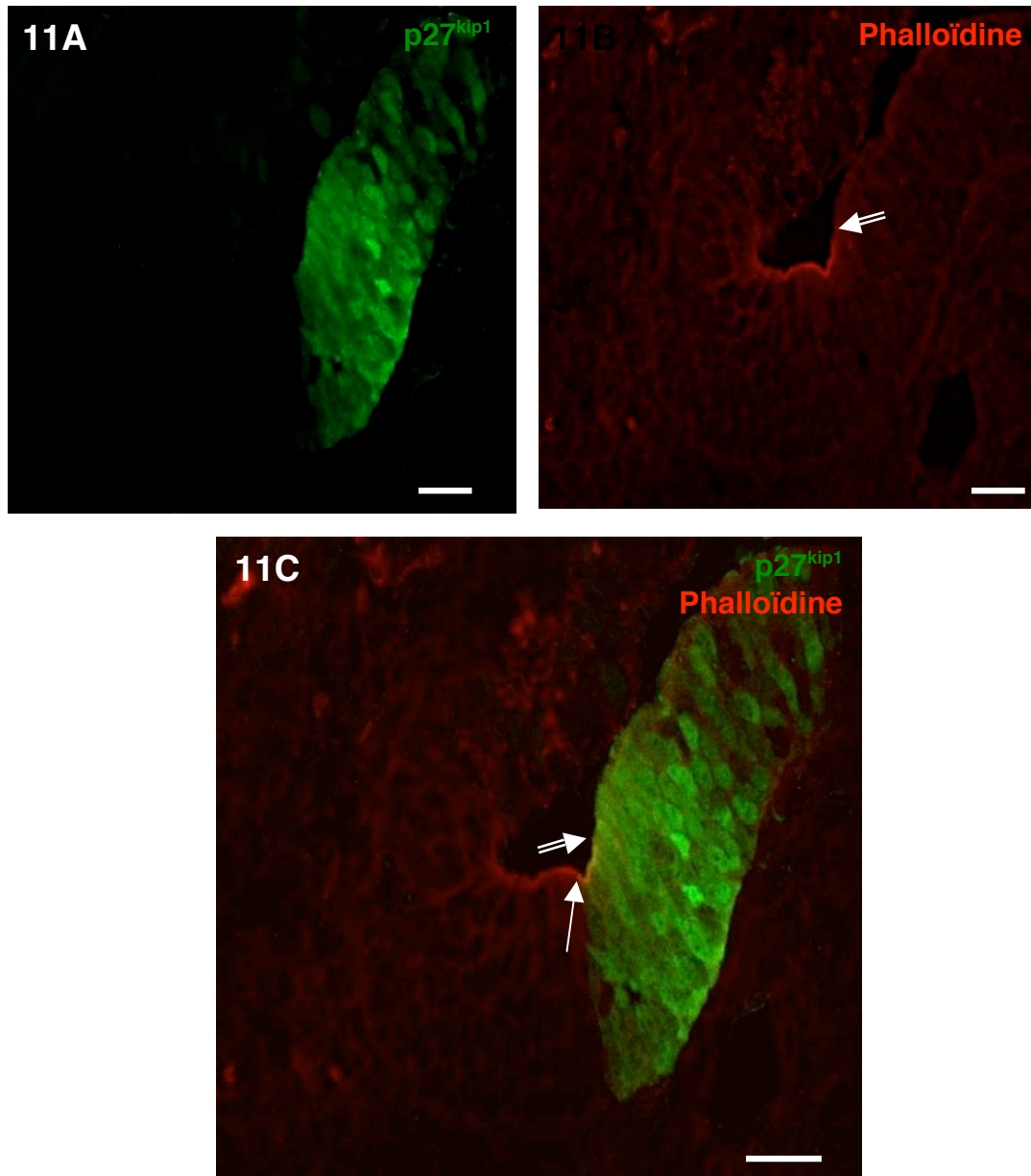


Figure 11. Détection de $p27^{kip1}$ (A) et des microvillosités (B) sur une même cryosection dans la base du canal cochléaire au stade E16. La superposition des images A et B (C) met en évidence les cellules à la fois $p27^{kip1}$ positives et phalloïdine positives (jaune). La partie externe est située sur la droite de la figure et la partie interne sur la gauche. Flèche pleine : dépression de l'épithélium dorsal du canal cochléaire ; double flèche : transition entre l'épithélium interne pourvu de nombreuses microvillosités et l'épithélium pauvre en extensions cytoplasmiques apicales. Barres : $18\mu\text{m}$.

3.2.3. Embryons de rat à 18 jours

A E18, nous constatons qu'en plus du ganglion spiral, une cellule de l'épithélium dorsal du canal cochléaire est p75^{ngfr} positive. Cette cellule est située dans la région basale du canal cochléaire à proximité du vaisseau spiral (Figures 12A et 12B).

Sur les cryosections marquées avec l'anti-S100A1, nous observons que dans la région basale du canal cochléaire, le nombre de cellules S100A1 positives s'est réduit. En effet, seules les cellules de l'épithélium dorsal à proximité du vaisseau spiral restent S100A1 positives (données non illustrées).

Egalement dans la région basale du canal cochléaire, à proximité du vaisseau spiral, nous remarquons qu'une seule cellule de l'épithélium dorsal est myosinVI positive (Figures 13A et 13B).

3.2.4. Embryons de rat à 19 jours

A E19 dans la région basale du canal cochléaire, nous remarquons que seules les cellules piliers sont p75^{ngfr} positives (Figures 14A et 14B). Dans la région apicale du canal cochléaire, à l'identique de ce que nous avons observé à E17 dans la région basale, plusieurs cellules de l'épithélium dorsal sont p75^{ngfr} positives (données non illustrées).

Nous constatons également que les cellules myosinVI positives peuvent être aisément identifiées comme étant les IHC et les OHC (Figure 15A). Dans la région médiane du canal cochléaire, les IHC sont toujours myosinVI positives ; les OHC le sont également mais avec moins d'intensité (Figure 15B). Dans la région médio-apicale du canal cochléaire, seules les IHC sont myosinVI positives (Figure 15C). Par contre, dans la région apicale, aucune cellule n'est myosinVI positive.

A ce stade dans la région basale du canal cochléaire, les cellules de l'organe de Corti sont aisément identifiables et il apparaît clairement que les cellules sensorielles sont p27^{kip1} négatives tandis que les cellules de soutien sont p27^{kip1} positives (Figure 16A). Nous observons également que le pôle apical des cellules sensorielles ainsi que celui des cellules du GER présente une nette positivité à la phalloïdine. Dans la région médiane du canal cochléaire, nous constatons qu'une seule cellule au sein de la zone p27^{kip1} positive est p27^{kip1} négative (Figure 16B). Par contre, dans la région apicale, aucune cellule de la zone p27^{kip1} positive n'est p27^{kip1} négative.

Dans la région basale du canal cochléaire, nous constatons que les IHC sont S100A1 positives ainsi que, dans une moindre mesure, les cellules phalangeaires (Figure 17A). Dans la région apicale, nous remarquons que les cellules de l'épithélium dorsal à proximité du vaisseau spiral sont S100A1 positives (Figure 17B).

Sur les cryosections marquées avec l'anti-FGF8, ce sont les membranes des cellules de l'épithélium dorsal du canal cochléaire qui sont FGF8 positives (Figure 18). Nous observons sur des ultrafines que le marquage FGF8 ne se répartit pas sur la membrane cytoplasmique des cellules. En effet, les particules d'or se localisent sur un matériel sous la membrane cytoplasmique. Nous remarquons de nombreuses particules d'or à proximité des complexes de jonction intercellulaire. Par contre, extrêmement peu de particules sont observées dans la partie centrale des cellules (Figure 19).

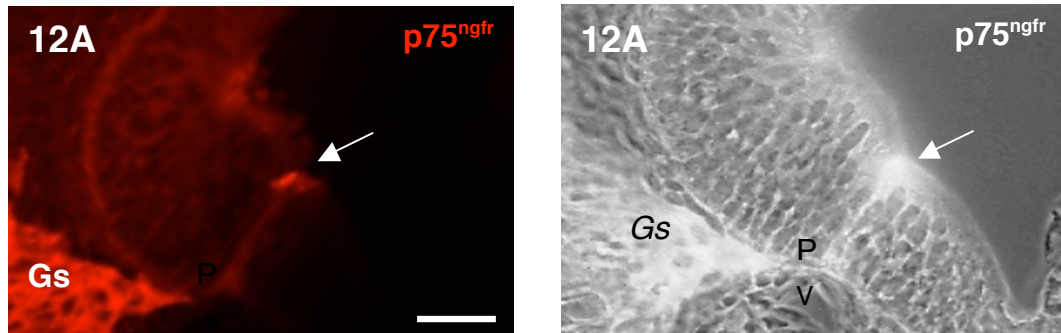


Figure 12. Mise en évidence de la cellule pilier ainsi que du ganglion spiral et de ses extensions par un marquage p75^{ngfr} sur une cryosection dans la base du canal cochléaire au stade E18. A : vue au microscope confocal à balayage laser. B : vue correspondante au microscope photonique à contraste de phase. La partie externe est située sur la droite de la figure et la partie interne sur la gauche. Flèche pleine : dépression de l'épithélium dorsal du canal cochléaire ; Gs : ganglion spiral ; P : cellule pilier ; V : vaisseau spiral. Barre : 16µm.

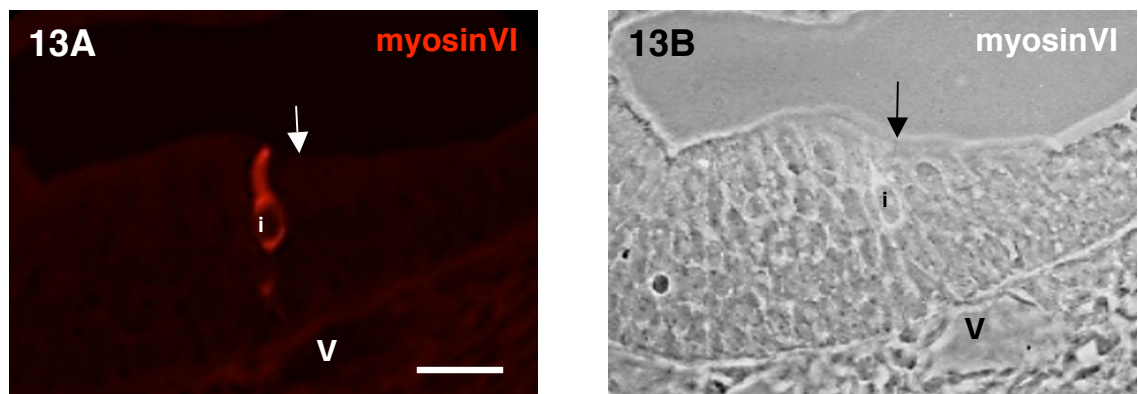


Figure 13. Mise en évidence des cellules sensorielles par un marquage myosinVI sur une cryosection dans la base du canal cochléaire au stade E18. A : vue au microscope confocal à balayage laser. B : vue correspondante au microscope photonique à contraste de phase. La partie externe est située sur la droite de la figure et la partie interne sur la gauche. Flèche pleine : dépression de l'épithélium dorsal du canal cochléaire ; i : IHC ; V : vaisseau spiral. Barre : 16µm.

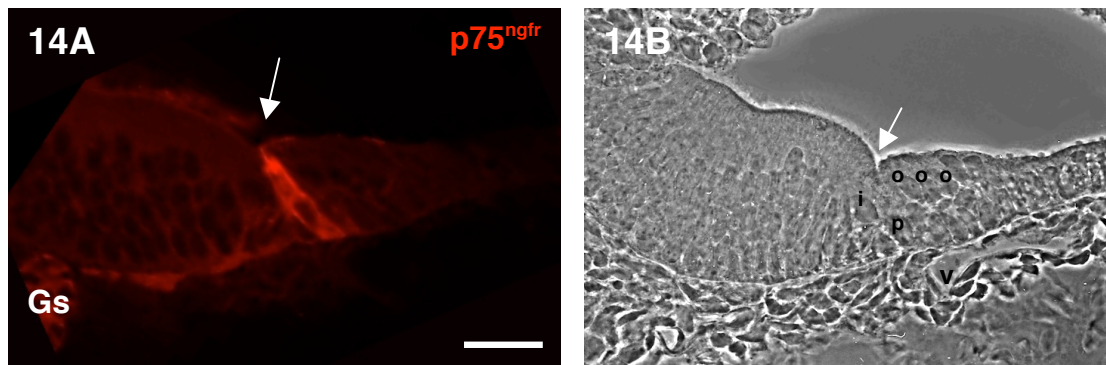


Figure 14. Mise en évidence de la cellule pilier ainsi que du ganglion spiral et de ses extensions par un marquage p75^{ngfr} sur une cryosection dans la base du canal cochléaire au stade E19. A : vue au microscope confocal à balayage laser. B : vue correspondante au microscope photonique à contraste de phase. La partie externe est située sur la droite de la figure et la partie interne sur la gauche. Flèche pleine : dépression de l'épithélium dorsal du canal cochléaire ; Gs : ganglion spiral ; i : IHC ; o : OHC P : cellule pilier ; V : vaisseau spiral. Barre : 16 μ m.

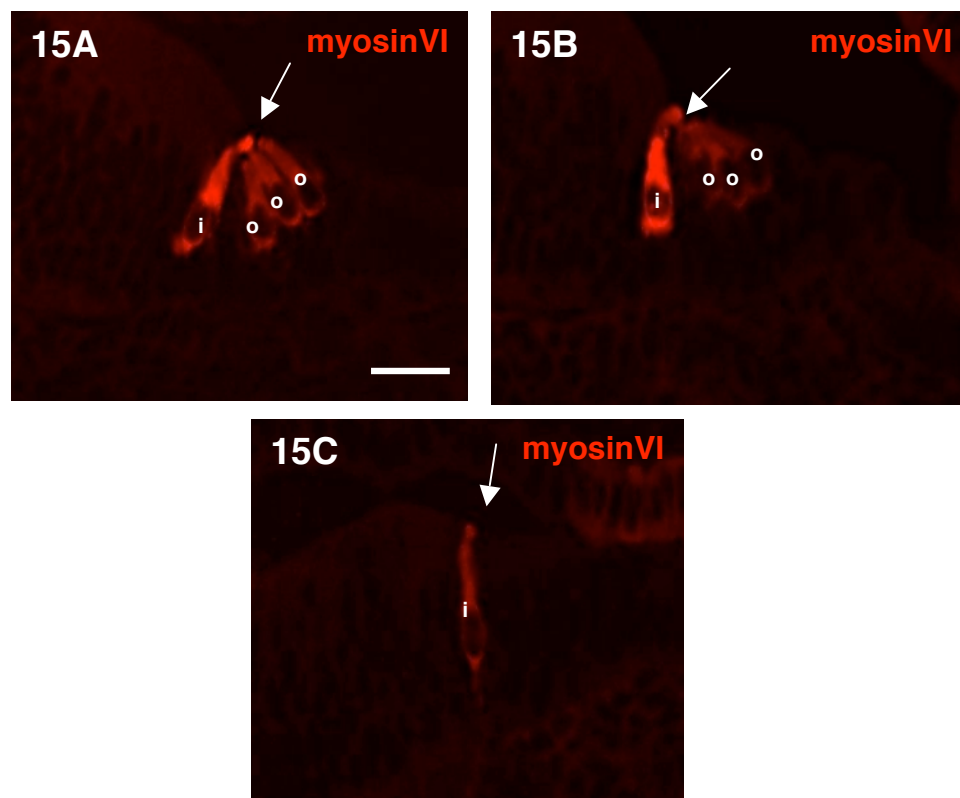


Figure 15. Mise en évidence des cellules sensorielles par un marquage myosinVI sur des cryosections au stade E19 dans la partie basale (A), médiane (B) et médio-apicale (C) du canal cochléaire. La partie externe est située sur la droite de la figure et la partie interne sur la gauche. Flèche pleine : dépression de l'épithélium dorsal du canal cochléaire ; i : IHC ; o : OHC ; V : vaisseau spiral. Barre : 16 μ m.

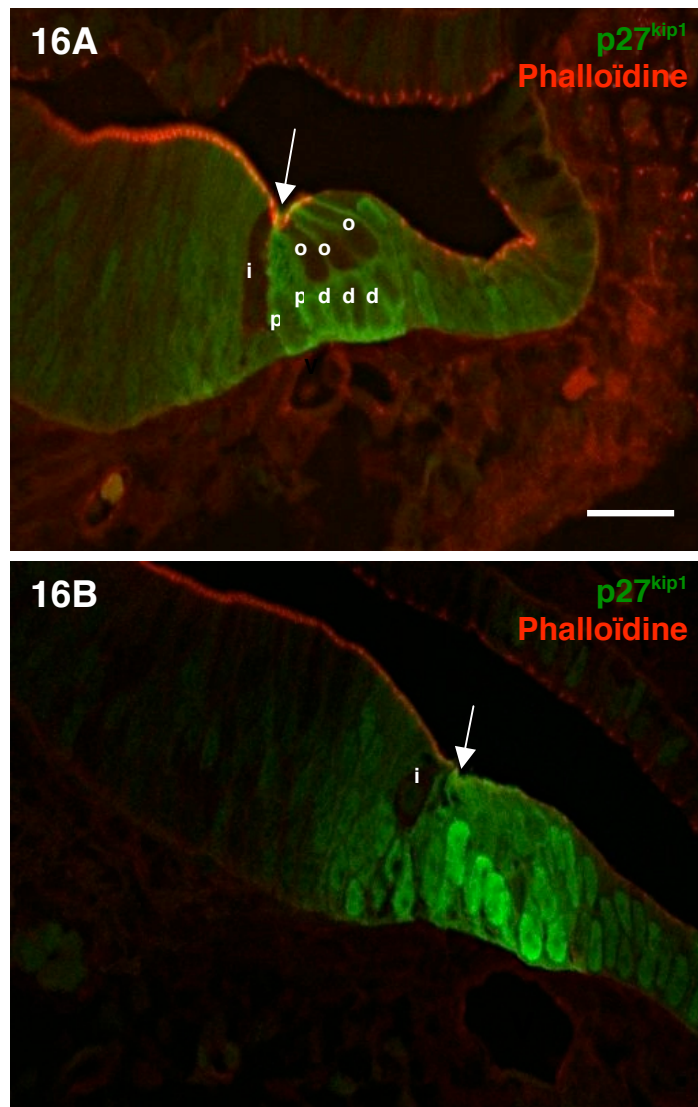


Figure 16. Mise en évidence de p27^{kip1} (en vert) et des microfilaments d'actine (en rouge) sur des cryosections dans la partie basale (A) et médiane (B) du canal cochléaire au stade E19. A : au niveau basal du canal cochléaire, les cellules de soutien sont p27^{kip1} positives et les cellules sensorielles sont p27^{kip1} négatives. B : dans la partie médiane, la cellule sensorielle interne est p27^{kip1} négative. La partie externe est située sur la droite de la figure et la partie interne sur la gauche. Flèche pleine : dépression de l'épithélium dorsal du canal cochléaire ; d : cellules de Deiters ; i : IHC ; o : OHC ; p : cellule pilier ; V : vaisseau spiral. Barre : 16 μ m.

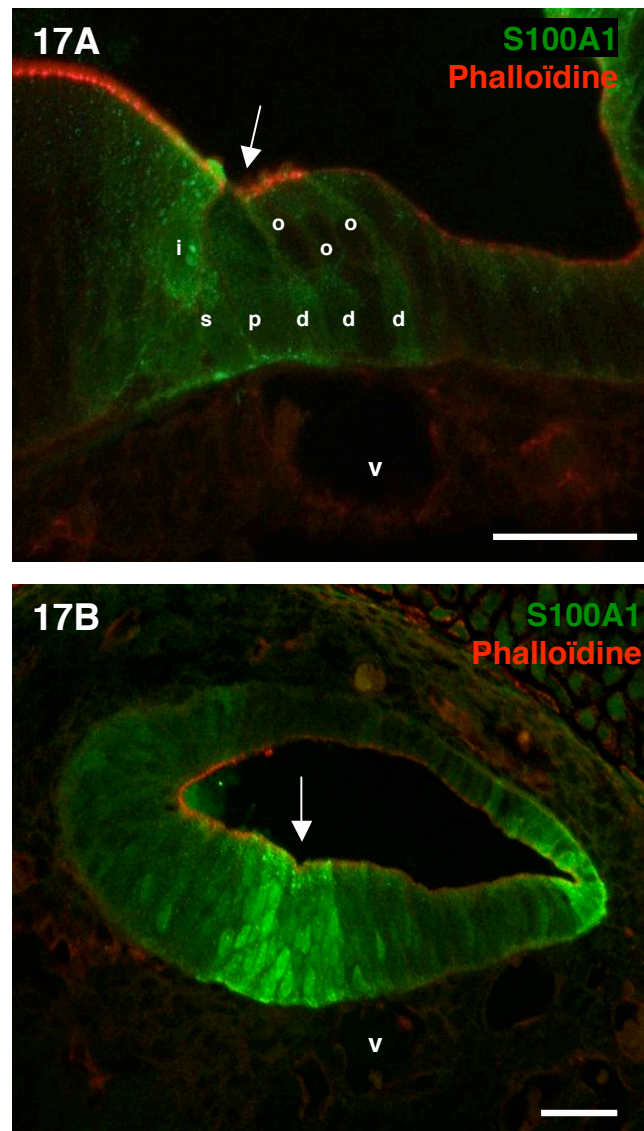


Figure 17. Mise en évidence de la protéine S100A1 (en vert) et des microfilaments d'actine (en rouge) sur des cryosections dans la partie basale (A) et apicale (B) du canal cochléaire. A : Dans la partie basale du canal cochléaire, les cellules sensorielles internes, les cellules phalangeaires et les cellules de Deiters sont S100A1 positives. B : Dans la partie apicale, le marquage est centré sur la dépression de l'épithélium dorsal du canal cochléaire. La partie externe est située sur la droite de la figure et la partie interne sur la gauche. Flèche pleine : dépression de l'épithélium dorsal du canal cochléaire ; d : cellules de Deiters ; i : IHC ; o : OHC ; p : cellule pilier ; s : cellule phalangeaire ; V : vaisseau spiral. Barre : 16 μ m.



Figure 18. Mise en évidence du ligand FGF8 (en vert) et des microfilaments d'actine sur une cryosection dans la base du canal cochléaire au stade E19. La partie externe est située sur la droite de la figure et la partie interne sur la gauche. Flèche pleine : dépression de l'épithélium dorsal du canal cochléaire . Barre : 18 μ m.

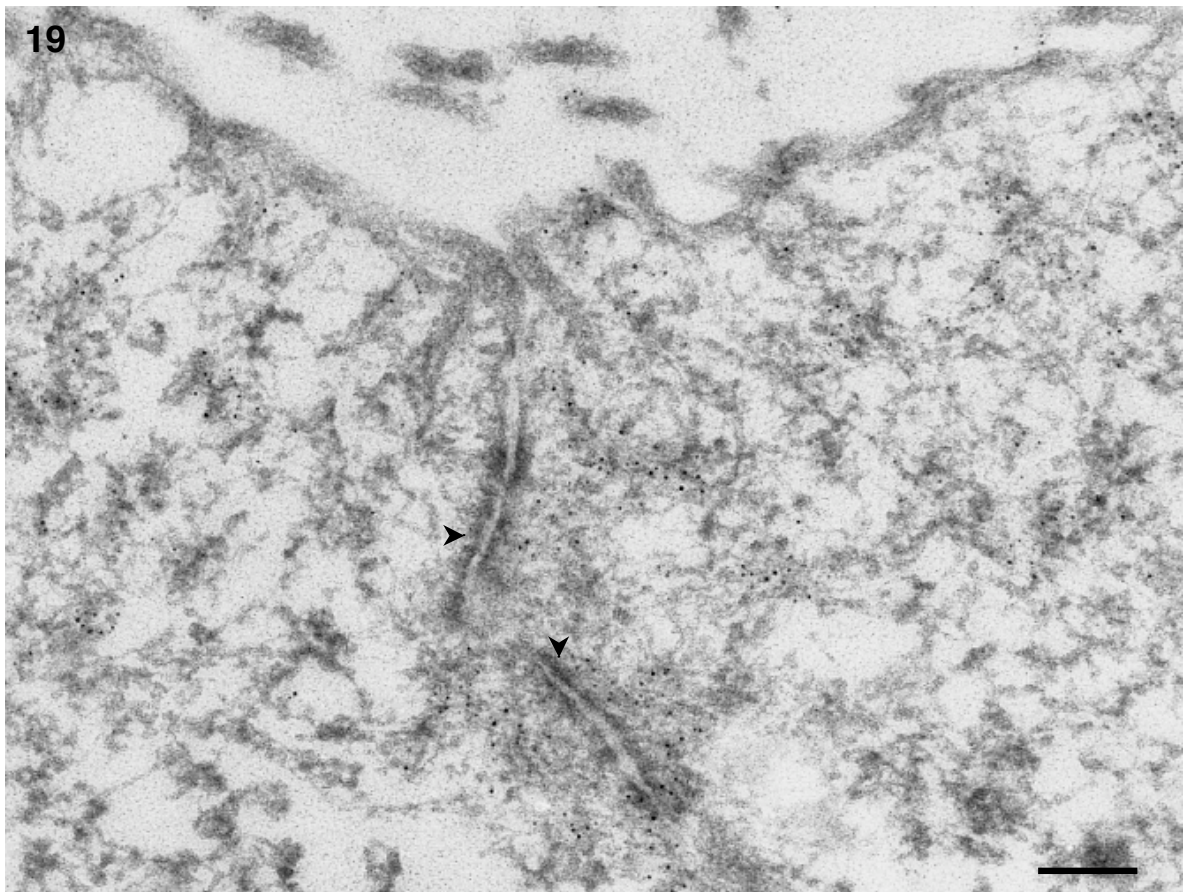


Figure 19. Détection ultrastructurale du ligand FGF8 dans la région apicale d'une cellule du GER au niveau de la base du canal cochléaire au stade E19. Les têtes de flèche indiquent la position du complexe de jonction. Le marquage est localisé sur un matériel sous-jacent à la membrane plasmique de la cellule. Barre : 0,2 μ m.

4.DISCUSSION GENERALE

4.1. Discussion générale

Notre objectif étant de préciser les résultats de notre mémoire de licence sur l'ordre et le site d'apparition des différentes cellules de l'organe de Corti au cours de sa mise en place prénatale chez le rat, nous avons, dans ce travail, utilisé quelques marqueurs typiques des cellules de l'organe de Corti et couramment utilisés : myosinVI, un marqueur précoce des cellules sensorielles (Hasson et al., 1997 ; Montcouquiol and Kelley, 2003), S100A1, un marqueur caractéristique des IHC, des cellules de Deiters et des cellules phalangeaires internes (Woods et al., 2004) ainsi que p75^{nfr}, un marqueur spécifique des cellules piliers (von Bartheld et al., 1991 ; Gestwa et al., 1999 ; Mueller et al., 2002 ; Sano et al., 2001 ; Woods et al., 2004). Avec ces marqueurs, il ne nous aura pas été possible de mettre en évidence les différentes cellules de l'organe de Corti chez le rat avant E18. En effet, ce n'est qu'à partir de E18 dans la région basale du canal cochléaire, que les IHC sont marquées par myosinVI (Figures 13A et 13B) et que seules les cellules piliers sont marquées par p75^{ngfr} (Figures 12A et 12B). Quant à S100A1, il ne marque spécifiquement les IHC et les cellules phalangeaires qu'à partir de E19 dans la région basale du canal cochléaire (Figure 17). C'est également à partir de E19 que les OHC sont reconnues par la myosinVI. Par l'emploi de ces quelques marqueurs, nous confirmons que les IHC apparaissent au cours du développement morphologique de l'organe de Corti avant les OHC. Déjà, dans notre mémoire de licence sur base de leur emplacement, nous avons identifier les IHC entre E17 et E18 et les OHC à partir de E18 c'est-à-dire plus ou moins 24 heures avant que les différents marqueurs ne nous le permettent.

Egalement dans notre mémoire de licence, nous avons fait une observation très importante au stade E17. A ce niveau de différenciation de l'organe de Corti, nous avons remarqué qu'une cellule, morphologiquement, se distinguait nettement des autres au sein de l'épithélium dorsal du canal cochléaire. Analysée au microscope électronique, cette cellule présentait des caractéristiques propres aux cellules piliers, entre autres un matériel non contrasté dans son cytoplasme. Suite à l'application de la méthode à l'acide périodique-thiocarbohydrazide-protéinate d'argent (Thiéry, 1967) sur notre matériel, il s'avère qu'entre E16 et E19, un seul type cellulaire de l'organe de Corti accumule de grandes quantités de polysaccharides : il s'agit des cellules piliers. Dans ces conditions, nous sommes le premier à avoir pu localiser les futures cellules piliers à un stade aussi précoce que E16 (Figure 6) c'est-à-dire 48 heures avant que ne soient reconnaissables les IHC. Des études précédentes menées sur de jeunes rats postnataux donnent à penser que le polysaccharide qui s'accumule dans le cytoplasme des cellules piliers pourrait être du glycogène (Hilding et al, 1977 ; Prieto et al., 1995). Toutefois, la présence d'un appareil de Golgi particulièrement développé à E17 et situé juste sous les dépôts de polysaccharide (Figure 9) nous incite à croire qu'il ne s'agit pas uniquement de glycogène. Nos travaux actuels portant sur des marquages à l'aide de lectines, protéines (dans notre cas, issues de végétaux) possédant des affinités spécifiques pour certains polysaccharides suggèrent qu'il s'agirait d'une accumulation de résidus de galactosyl N-acétyl-galactosamine, un constituant typique du mucus ou des glycoaminoglycans.

Notre intérêt pour les cellules piliers nous a poussé à tenter de rechercher le FGF8 dans notre matériel. Différents auteurs (Jacques et al., 2006 ; Pirvola et al., 2002) ont proposé que FGF8 pourrait être un ligand spécifique à FGFR3 et qu'un gradient de FGF8 partant des IHC serait responsable de la différenciation des cellules piliers. Sur les cryosections, il ne nous a pas été possible de montrer l'existence d'un tel gradient et aucune cellule de l'épithélium dorsal du canal cochléaire n'est particulièrement mise en évidence par un marqueur anti-FGF8. Nous constatons que la présence de FGF8 semble se cantonner à la périphérie des cellules. Sur les coupes ultrafines, nous montrons que FGF8 n'est pas associé à la membrane cytoplasmique mais serait plutôt lié au cytosquelette des cellules (Figure 19).

Dans quelle région de l'épithélium dorsal du canal cochléaire se situe l'origine de l'organe de Corti reste jusqu'à présent sujet à discussion. En effet, certains auteurs pensent que toutes les cellules qui formeront l'organe de Corti proviennent du GER (Lim and Rueda, 1992) tandis que d'autres proposent que les IHC se développeraient à partir GER, les OHC dans le LER et les cellules piliers entre le GER et le LER (Kelley and Bianchi, 2001 ; Lim and Anniko, 1985). Notre observation au microscope électronique à transmission de l'épithélium dorsal du canal cochléaire à E16 montre que de part et d'autre de la future cellule pilier, le pôle apical des cellules présente de nombreuses microvillosités. Nous constatons également que du côté externe à la cellule pilier seulement 8 à 9 cellules possèdent des microvillosités (Figure 7). De plus, sur les coupes optiques sur lesquelles un double marquage p27^{kip1}/phalloïdine a été réalisé, seule une partie des cellules p27^{kip1} positives sont marquées par la phalloïdine au niveau de leur pôle apical (Figure 11C). Etant donné que la présence de microvillosités composées de microfilaments d'actine (Junqueira et al., 1995) est significative de cellules du GER, il en résulte de nos observations faites soit au microscope électronique à transmission, soit au microscope confocal à balayage laser que manifestement toutes les cellules à l'origine du futur organe de Corti se développeraient dans le GER et non depuis la zone séparant le GER du LER.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Abdoun A.**, Despres G., Romand R. 1994. *Histochemical and scanning electron microscopic studies of supernumerary hair cells in embryonic rat cochlea in vitro*. Brain Res. **660**(2):181-91.
- Anniko M.** 1983. *Cytodifferentiation of cochlear hair cells*. Am. J. Otolaryngol. **4**(6):375-88.
- Arjmand E.**, Harris D., Dallos P. 1988. *Developmental changes in frequency mapping of the gerbil cochlea: comparison of two cochlear locations*. Hear. Res. **32**(1):93-6.
- Berglund A.M.**, Ryugo D.K. 1987. *Hair cell innervation by spiral ganglion neurons in the mouse*. J. Comp. Neurol. **255**(4):560-70.
- Bredberg G.** 1968. *Cellular pattern and nerve supply of the human organ of Corti*. Acta Otolaryngol. Suppl. **236**:1-18
- Chen P.**, Johnson J.E., Zoghbi H.Y., et al. 2002. *The role of Math1 in inner ear development: Uncoupling the establishment of the sensory primordium from hair cell fate determination*. Development **129**(10):2495-505.
- Chen P.**, Segil N. 1999. *p27(Kip1) links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti*. Development. **126**(8):1581-90.
- Colvin J.S.**, Bohne BA, Harding GW, et al. 1996. *Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3*. Nat. Genet. **12**:390-397.
- Corti A.** 1851. *Recherches sur l'organe de Corti de l'ouïe des mammifères*. Z. wiss. Zool. **3**:1-106.
- Donato R.** 1991. *Perspectives in S-100 protein biology*. Cell Calcium. **12**(10):713-26.
- Gestwa G.**, Wiechers B., Zimmermann U., et al. 1999. *Differential expression of trkB.T1 and trkB.T2, truncated trkC, and p75NGFR in the cochlea prior to hearing function*. J Comp Neurol **414**:33-49.
- Hasson T.**, Gillespie P.G., Garcia J.A. 1997. *Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia*. J. Cell. Biol. **137**(6):1287-307.
- Hilding D.A.**, Bahia I., Ginzberg R.D. 1977. *Glycogen in the cochlea during development*. Acta Otolaryngol. **84**(1-2):12-23.
- Ito M.**, Spicer S.S., Schulte B.A. 1995. *Cytological changes related to maturation of the organ of Corti and opening of Corti's tunnel*. Hear. Res. **88**:107-123.

- Jacques B.**, Layman E., Lewandoski M., Kelley M.W. 2006. *The Fgf8 signaling pathway plays an inductive role in pillar cell development*. ARO Abstr. **29**:99-100.
- Junqueira L.C.**, Carneiro J., Kelley R.O. 1995. *Basic histology*. 8nd (Appleton and Lange ed.), New Jersey, United States of America. 488p.
- Kaltenbach J.A.**, Falzarano P.R. 1994. *Postnatal development of the hamster cochlea. I. Growth of hair cells and the organ of Corti*. J. Comp. Neurol. **340**(1):87-97.
- Kelley M.W.**, Bianchi L.M. 2001. Developement and neuronal innervation of the organ of Corti. In *Handbook of Mouse auditory research - From behavior to molecular biology* (Willott J.F., ed) pp. 137-157, CRC Press LLC, Boca Raton, FL.
- Lee Y.S.**, Liu F., Segil N. 2006. *A morphogenetic wave of p27Kip1 transcription directs cell cycle exit during organ of Corti development*. Development **133**(15):2817-26.
- Lenoir M.**, Puel J.L., Pujol R. 1987. *Stereocilia and tectorial membrane development in the rat cochlea*. A SEM study. Anat. Embryol. (Berl). **175**(4):477-87.
- Lenoir M.**, Shnerson A., Pujol R. 1980. *Cochlear receptor development in the rat with emphasis on synaptogenesis*. Anat. Embryol. (Berl). **160**(3):253-62.
- Lim D.J.**, Anniko M. 1985. *Developmental morphology of the mouse inner ear. A scanning electron microscopic observation*. Acta Otolaryngol. Suppl. **422**:1-69.
- Lowenheim H.**, Furness D.N., Kil J., et al. 1999. Gene disruption of p27(Kip1) allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of corti. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **96**(7):4084-8.
- Malgrange B.**, Belachew S., Thiry M., et al. 2002. *Proliferative generation of mammalian auditory hair cells in culture*. Mech. Dev. **112**:79 88.
- Malgrange B.**, Thiry M., Van De Water T.R., et al. 2002. *Epithelial supporting cells can differentiate into outer hair cells and Deiters' cells in the cultured organ of Corti*. Cell. Mol. Life Sci. **59**(10):1744-57.
- Marovitz W.F.**, Shugar J.M.A, Khan K.M. 1976. *The role of cellular degeneration in the normal development of (rat) otocyst*. Laryngoscope **86**:1413-1425.
- Montcouquiol M.**, Kelley M.W. 2003. *Planar and vertical signals control cellular differentiation and patterning in the mammalian cochlea*. J. Neurosci. **23**(28):9469–78.

- Morita H.**, Hoshino T., Mizuta K., et al. 1996. *Scanning electron microscopic study of the postnatal development of the rabbit cochlea, with an emphasis on innervation*. Scanning Microsc. **10**(1):165-76.
- Mu M.Y.**, Chardin S., Avan P., Romand R. 1997. *Ontogenesis of rat cochlea. A quantitative study of the organ of Corti*. Dev. Brain Res. **99**(1):29-37.
- Mueller K.L.**, Jacques B.E., Kelley M.W. 2002. *Fibroblast growth factor signaling regulates pillar cell development in the organ of Corti*. J. Neurosci. **22**(21):9368-77.
- Nakai Y.**, Hilding D. 1968. *Cochlear development. Some electron microscopic observations of maturation of hair cells, spiral ganglion and Reissner's membrane*. Acta Otolaryngol. **66**(5):369-85.
- Nishizaki K.**, Anniko M., Orita Y., et al. 1998. *Programmed cell death in the developing epithelium of the mouse inner ear*. Acta Otolaryngol. (Stockh). **118**:96-100.
- Peters K.**, Ornitz D., Werner S., et al. 1993. *Unique expression pattern of the FGF receptor 3 gene during mouse organogenesis*. Dev. Biol. **155**(2):423-30.
- Pirvola U.**, Cao Y., Oellig C., et al. 1995. *The site of action of neuronal acidic fibroblast growth factor is the organ of Corti of the rat cochlea*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **92**:9269-9273.
- Pirvola U.**, Ylikoski J., Trokovic R., et al. 2002. *FGFR1 is required for the development of the auditory sensory epithelium*. Neuron. **35**(4):671-80.
- Pirvola U.**, Ylikoski J., Virtanen I. 1990. *Immunohistochemical localization of nonerythroid spectrin (fodrin) in the sensory cells of the vestibular end organs of the rat and guinea pig*. ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec. **52**(2):127-32.
- Pujol R.**, Hilding D. 1973. *Anatomy and physiology of the onset of auditory function*. Acta Otolaryngol. **76**(1):1-10.
- Pujol R.**, Lavigne-Rebillard M., Lenoir M. 1998. *Development of sensory and neural structures in the mammalian cochlea*. In Development of the auditory system (Rubel E.W., Popper A.N., Fay R.R., eds) pp. 146-192, Springer-Verlag, New York.
- Prieto J.J.**, 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**(1):67-75
- Raphael Y.**, Altschuler R.A. 2003. *Structure and innervation of the cochlea*. Brain Res. Bull. **60**(5-6):397-422.

- Reynolds E.** 1963. *The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.* J. Cell. Biol. **17**:208-212.
- Romand R.**, Zine A.E., Hafidi A. 1993. *Ontogenesis of F-actin in hair cells.* Cell. Motil. Cytoskeleton. **25**(3):213-22.
- Roth B.**, Bruns V. 1992. *Postnatal development of the rat organ of Corti. II. Hair cell receptors and their supporting elements,* Anat. Embryol., **185**:571-581.
- Rubel E.W.**, Fritzsche B. 2002. *Auditory system development: Primary auditory neurons and their targets.* Annu. Rev. Neurosci. **25**:51-101.
- Ruben R.J.** 1967. *Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses.* Acta Otolaryngol. Suppl. **220**:1-44.
- Rueda J.**, Prieto J.J., Rubio M.E., Gutierrez A., Merchan J.A. 1993. *Development of the tectal cells in the mouse cochlea.* Anat. Embryol. (Berl) **187**(5):425-32.
- Sano H.**, Mukai J., Monoo K., et al. 2001. *Expression of p75^{NTR} and its associated protein NADE in the rat cochlea.* Laryngoscope. **111**(3):535-8.
- Sato M.**, Leake P.A., Hradek G.T. 1999. *Postnatal development of the organ of Corti in cats: a light microscopic morphometric study.* Hear. Res. **127**:1-13.
- Sher A.E.** 1971. *The embryonic and postnatal development of the inner ear of the mouse.* Acta Otolaryngol. Suppl. **285**:1-77.
- Spicer S.S.**, Schulte B.A. 1994. *Ultrastructural differentiation of the first Hensen cell in the gerbil cochlea as a distinct cell type.* Anat. Rec. **240**(2):149-56.
- Thiéry J.P.** 1967. *Mise en évidence des polysaccharides sur. coupes fines en microscopie électronique.* J. Microsc. **6**:987–1018.
- Thorn L.** 1975. *The development of the organ of Corti in the guinea pig.* Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol. **51**(6):5-94.
- Vater M.**, Lenoir M., Pujol R. 1997. *Development of the organ of Corti in horseshoe bats: scanning and transmission electron microscopy.* J. Comp. Neurol. **377**(4):520-34.
- Von Bartheld C.S.**, Patterson S.L., Heuer J.G., et al. 1991. *Expression of nerve growth factor (NGF) receptors in the developing inner ear of chick and rat.* Development **113**:455–470.
- Woods C.**, Montcouquiol M., Kelley M.W. 2004. *Math1 regulates development of the sensory epithelium in the mammalian cochlea.* Nat. Neurosci. **7**(12):1310–8.
- Zine A.**, Hafidi A., Romand R. 1995. *Fimbrin expression in the developing rat cochlea.* Hear. Res. **87**(1-2):165-9.

Zine A., Romand R. 1996. *Development of the auditory receptors of the rat: a SEM study*. Brain Res. **721**(1-2):49-58.