



**HAL**  
open science

## Codage de l'enveloppe temporelle dans le nerf auditif

Florian Hasselmann

► **To cite this version:**

Florian Hasselmann. Codage de l'enveloppe temporelle dans le nerf auditif. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT049 . tel-01684259

**HAL Id: tel-01684259**

**<https://theses.hal.science/tel-01684259v1>**

Submitted on 15 Jan 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR  
DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER**

**En Neurosciences**

**École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé**

**UNITE DE RECHERCHE INSERM U1051  
INSTITUT DES NEUROSCIENCES DE MONTPELLIER**

**CODAGE DE L'ENVELOPPE  
TEMPORELLE  
DANS LE NERF AUDITIF**

**Présentée par Florian HASSELMANN  
Le 21 novembre 2017**

**Sous la direction de Jean-Luc PUEL  
et Jérôme BOURIEN**

**Devant le jury composé de**

**M. André CHAYS, Professeur, Université de Reims Champagne - Ardennes**

**M. Stéphane ROMAN, PA-PH, Université de Marseille, INSERM U1106**

**M. Jérôme BOURIEN, Maître de Conférences, Université de Montpellier, INSERM U1051**

**M. Jean-Luc PUEL, Professeur, Université de Montpellier, INSERM U1051**

**Président**

**Rapporteur**

**Co-directeur de thèse**

**Directeur de thèse**



**UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER**

A Gilles GULLARM,  
*sans qui rien n'aurait été possible*

## Résumé

**Contexte** : La compréhension de la parole dans le silence est dépendante des mécanismes de codage de l'enveloppe temporelle du signal sonore. Une anomalie du codage (d'origine infectieuse, immunitaire, génétique, tumorale, ou environnementale) entraîne irrémédiablement une diminution des performances audiométriques vocales. Les méthodes d'exploration fonctionnelle de la cochlée (potentiels d'action composite du nerf auditif, potentiel évoqués auditifs précoces) utilisent des *stimuli* sonores simples (clics, bouffées tonales) pour détecter une anomalie de codage des indices temporels. Le but de cette étude était de développer une méthode électrophysiologique capable de mesurer les réponses du nerf auditif à des *stimuli* modulés en amplitude.

**Matériel et méthodes** : La réponse électrophysiologique du nerf auditif a été mesurée à l'aide d'une électrode placée sur la niche de la fenêtre ronde de la cochlée de gerbilles et de rats vieillissants. Les *stimuli* acoustiques consistaient en des bandes de bruit de 20 secondes modulées sinusoïdalement en amplitude et centrées sur 4, 8 et 16 kHz. Nous avons étudié le niveau, la profondeur de modulation, la fréquence de modulation et la fréquence porteuse.

**Résultats** : Notre étude sur le modèle de perte sélective neuronale (ouabain) montre que l'analyse des potentiels globaux cochléaires permet de détecter une perte de fibres à basse activité spontanée dans le nerf auditif, résultat important car indétectable (« surdités cachées ») actuellement avec les tests utilisés en routine en clinique (EcoG et PEA) (Batrel, Huet, Hasselmann *et al*, Plos One 2017). Ensuite, en combinant le stimulus de cette étude avec une fonction sinusoïdale, nous avons développé et validé une méthode pour évaluer la qualité de codage de l'enveloppe par le nerf auditif. Nous avons appliqué cette méthode sur un modèle de vieillissement (rat Sprague-Dawley). Nos résultats suggèrent que le vieillissement entraîne une modification du phénotype des fibres du nerf auditif sans pertes de fibres associées (article Ocelli, Hasselmann *et al*, soumis à eNeuro).

**Conclusion** : Notre travail démontre qu'il est indispensable d'élargir le nombre de techniques d'exploration fonctionnelle de la cochlée car les tests utilisés en routine en clinique ne permettent pas de déceler des déficits subtils d'encodage dans le nerf auditif. La mesure de l'activité soutenue des fibres permet de détecter la perte sélective des neurones à basse activité spontanée, indétectable avec les méthodes classiques. Le changement de phénotype des fibres observé au cours du vieillissement du rat Sprague-Dawley est détectable avec notre méthode alors qu'il ne l'est pas avec le potentiel d'action composite du nerf auditif.

**Mots clés** : Enveloppe temporelle, fibres du nerf auditif, modulation d'amplitude

## Summary

**Background:** Speech intelligibility in quiet is critically dependent on the temporal envelope of a sound signal. An abnormal coding of this temporal cue (due to infectious, immune, genetic, tumoral or environmental of origin) implies a decrease of speech recognition scores. The current proxy to probe deafness in clinical framework (Compound Action Potential of the auditory nerve, auditory brainstem responses) uses simplistic stimuli (clicks, tone bursts) to detect a such abnormal coding of the temporal cues. The aim of this study was to develop a new electrophysiology method in murins able to measure the auditory nerve responses to amplitude-modulation stimuli.

**Material and methods:** The electrophysiology response of the auditory nerve was recorded using an electrode implanted onto the round window niche on normal-hearing gerbil cochlea and aging rat cochlea. The acoustical stimuli consisted of 20 seconds sinusoidally amplitude-modulated noise-band centered on 4, 8 and 16 kHz. We have studied varying sound level, the modulation depth, the modulation frequency and the carrier frequency.

**Results:** Our study on the selective fiber loss ouabain model show the mass potentials recorded at the round window enable the detection of low spontaneous rate fibers in gerbil auditory nerve. This result is important because the current clinical used tests aren't enough sensitive to detect a such coding impairment (CAP, ABR) (Batrel, Huet, Hasselmann et al., 2017). Then we combined the stimulus of this previous study with a sinusoidal function to develop a new method to assess the envelope coding by the auditory nerve. We validated this new method. Last, we used our method on an aging model (Sprague-Dawley rat). Our results suggest aging leads to a phenotype change of auditory nerve fibers without associated fiber loss (article Occelli, Hasselmann et al, submitted to eNeuro).

**Conclusion:** Our study shows it's indispensable to expand the number of tools to probe the cochlea because the current clinical used tests aren't enough sensitive to detect subtle deficits of encoding in the auditory nerve. The recording of the fiber sustained activity enable to detect the selective loss of low-spontaneous rate neurons. A such loss is undetectable with classical clinical tools. The phenotype change of fibers we observed in aging Sprague-Dawley rats is detectable with our method whereas it's not using the compound action potential of the auditory nerve.

**Key words:** Temporal Envelope, Auditory Nerve Fibers, Amplitude Modulation.

## TABLE DES MATIERES

1. Introduction.....	7
2. Rappels .....	9
2.1. Le système auditif périphérique.....	9
2.1.1. L'oreille externe.....	9
2.1.2. L'oreille moyenne .....	10
2.1.3. L'oreille interne .....	11
2.2. Organe sensori-nerveux de la cochlée .....	13
2.2.1. Les fluides cochléaires .....	13
2.2.1.1. Gradient électrochimique du potassium.....	13
2.2.1.2. Importance de l'homéostasie potassique .....	15
2.2.2. Les cellules sensorielles.....	15
2.2.2.1. Rôle actif des cellules ciliées externes .....	17
2.2.2.2. Transfert de l'information par les cellules ciliées internes .....	21
2.2.2.3. Potentiels de récepteur des cellules ciliées .....	21
2.2.3. Les synapses à ruban des cellules ciliées.....	23
2.2.3.1. Organisation des synapses à ruban .....	23
2.2.3.2. Exocytose rapide et soutenue dans le temps.....	25
2.2.3.3. Hétérogénéité des synapses .....	26
2.3. Neurones cochléaires .....	28
2.3.1. Innervation de l'organe de Corti .....	28
2.3.1.1. Innervation des cellules ciliées externes.....	28
2.3.1.2. Innervation des cellules ciliées internes.....	31
2.3.2. Neurones auditifs primaires .....	32
2.3.2.1. Morphologie.....	32
2.3.2.2. Enregistrements unitaires .....	33
2.3.2.3. Réponses des fibres en fonction de la fréquence .....	35
2.3.2.4. Réponses des fibres en fonction de l'intensité .....	37
2.3.2.5. Réponses des fibres en fonction du temps .....	38
2.3.3. Potentiels électriques globaux .....	44
2.3.3.1. Potentiel d'action composite du nerf auditif .....	45
2.3.3.2. Potentiels évoqués auditifs précoces (PEAP) .....	46
2.3.3.3. Potentiels stationnaires (ASSR) .....	47
2.4. La presbyacousie .....	47

2.4.1. Données cliniques.....	48
2.4.1.1. Facteurs environnementaux .....	49
2.4.1.2. Facteurs génétiques .....	51
2.4.2. Données expérimentales.....	52
2.4.2.1. Presbyacousie sensorielle .....	53
2.4.2.2. Presbyacousie neurale .....	53
2.4.2.2. Presbyacousie striatale.....	55
<b>3. Matériel et Méthodes .....</b>	<b>58</b>
3.1. Animaux.....	58
3.2. Préparation des drogues .....	58
3.3. Implantation des électrodes et application des drogues.....	59
3.3. Exploration fonctionnelle .....	60
3.3.1. Produits de distorsion acoustiques .....	61
3.3.2. Potentiels cochléaires.....	61
3.3.2.1. Potentiel d'action composite du nerf auditif (PAC).....	62
3.3.2.2. Activité soutenue du nerf auditif .....	62
3.3.2.4. Enveloppe temporelle de la réponse neurale .....	63
3.4. Investigation morphologique .....	64
3.4.1. Immunohistochimie .....	64
3.4.2. Imagerie confocale .....	64
3.4.3. Reconstruction 3D .....	65
3.5. Analyse des données .....	66
3.5.1. Indice de synchronisation.....	67
3.5.2. Analyse statistique .....	67
<b>4. Résultats .....</b>	<b>68</b>
4.1. Réponse du nerf auditif à une bande de bruit pulsée.....	68
4.1.1. Protocole de stimulation et d'analyse.....	69
4.1.2. Le gain neural reflète la distribution des fibres à basse activité spontanée.....	71
4.1.3. Quantification des synapses à ruban par cellule ciliée interne.....	73
4.2. Réponse du nerf auditif à une bande de bruit continue modulée en amplitude .....	76
4.2.1. Protocole d'analyse et de stimulation.....	76
4.2.2. Origine nerveuse de la réponse.....	77
4.2.3 Effet du niveau de stimulation .....	78
4.2.4. Effet de la profondeur de modulation .....	79

4.2.5. Effet de la fréquence de modulation (FM) .....	80
4.2.6. Indice de synchronisation.....	81
4.2.7 Comparaison avec des enregistrements unitaires .....	82
4.3. Réponse du nerf auditif au cours du vieillissement .....	83
4.3.1. Produits de distorsion acoustique.....	84
4.3.2. Potentiels d'action composites du nerf auditif .....	84
4.3.2.1. Seuil auditifs .....	85
4.3.2.2. Amplitude du PAC en fonction de l'intensité de stimulation .....	86
4.3.2.3. Amplitude du PAC en fonction de la fréquence de stimulation.....	87
4.3.3. Réponse à des sons modulés en amplitude .....	89
4.3.4. Comptages de synapses .....	90
4.3.5. Densité spectrale de puissance du bruit de fond cochléaire .....	91
5. Discussion.....	93
5.1. Neuropathie auditive induite par application d'ouabaïne .....	93
5.2. Vieillesse chez le rat Sprague Dawley .....	95
6. Conclusion.....	100
7. Références .....	101
8. Remerciements.....	119



# 1. Introduction

La cochlée est l'organe périphérique de l'audition ayant pour fonction de transformer le signal sonore en un message nerveux interprétable par le système nerveux central. Quatre rangées de cellules ciliées sont disposées tout au long de la cochlée. Parmi ces cellules ciliées, on distingue : 1) les cellules ciliées externes (CCE, 3 rangées) qui augmentent l'amplitude et la sélectivité fréquentielle de la stimulation mécanique ; et 2) les cellules ciliées internes (CCI, 1 rangée) qui assurent le transfert de la stimulation aux fibres du nerf auditif. Chaque CCI est innervée par un grand nombre de fibres afférentes présentant différentes propriétés fonctionnelles. Tandis que certaines fibres sont activées dès les bas niveaux de stimulation (codage des seuils auditifs), d'autres fibres sont spécialisées dans le codage des niveaux supraliminaires.

Une perte sélective de CCE entraîne inévitablement une perte d'amplification mécanique et donc une élévation des seuils auditifs (Liberman and Dodds, 1984; Davis et al., 1989) observable en clinique à l'aide d'une simple audiométrie tonale. En revanche, si ce sont les fibres afférentes qui disparaissent sélectivement, les seuils auditifs peuvent rester quasi normaux malgré une perte de fibres (désafférentation) pouvant atteindre 50% (Kujawa and Liberman, 2009; Bourien et al., 2014). Cette difficulté réside dans le fait que les fibres les plus sensibles au bruit (Furman et al., 2013) ou au vieillissement (Sergeyenko et al., 2013) sont celles qui codent pour les seuils audiométriques les plus élevés. Ce faisant, l'audiométrie qui ne teste que les seuils liminaires ne rend pas compte de la perte des fibres codant pour les fortes intensités de stimulations. L'autre difficulté est que les tests électrophysiologiques comme les potentiels évoqués auditifs (PEA) du tronc cérébral ou le potentiel d'action composite (PAC) du nerf auditif reposent sur l'enregistrement de l'activité synchrone des fibres du nerf auditif. Dans ce cas, un nombre restreint de fibres répondant en synchronie suffisent à évoquer une réponse électrophysiologique. De plus, les fibres codant les fortes intensités ne répondent pas de manière synchrone à la stimulation sonore, rendant difficile leur détection dans les réponses électrophysiologiques classique (PAC et/ou PEA).

Cette difficulté nous a donc incité à développer un test électrophysiologique, non plus basé sur une réponse synchrone, mais sur l'activité soutenue (asynchrone) des fibres du nerf auditif en réponse à une stimulation acoustique. Cette technique a été utilisée pour le monitoring de l'activité spontanée (Cazals et al., 1998) et évoquée du nerf auditif (Cazals and Huang, 1996). Contrairement à la réponse synchrone menée dans le domaine temporel, l'analyse de la réponse soutenue est conduite dans le domaine fréquentiel. Nous avons ensuite étendu cette technique à l'évaluation de la modulation l'amplitude (enveloppe temporelle) des signaux acoustiques par le nerf auditif. La méthode a été mise au point et testée sur des gerbilles jeunes. Nous avons ensuite comparé la sensibilité de cette méthode avec l'amplitude du potentiel d'action composite (PAC) chez des rats au cours du vieillissement. L'ensemble de nos résultats démontrent que ses nouvelles techniques électrophysiologiques permettent de déceler des défauts de codage indétectables avec les techniques d'exploration fonctionnelle existantes mais qui pourraient expliquer certains déficits auditifs chez l'homme (Starr et al., 1996; Zeng et al., 2005).

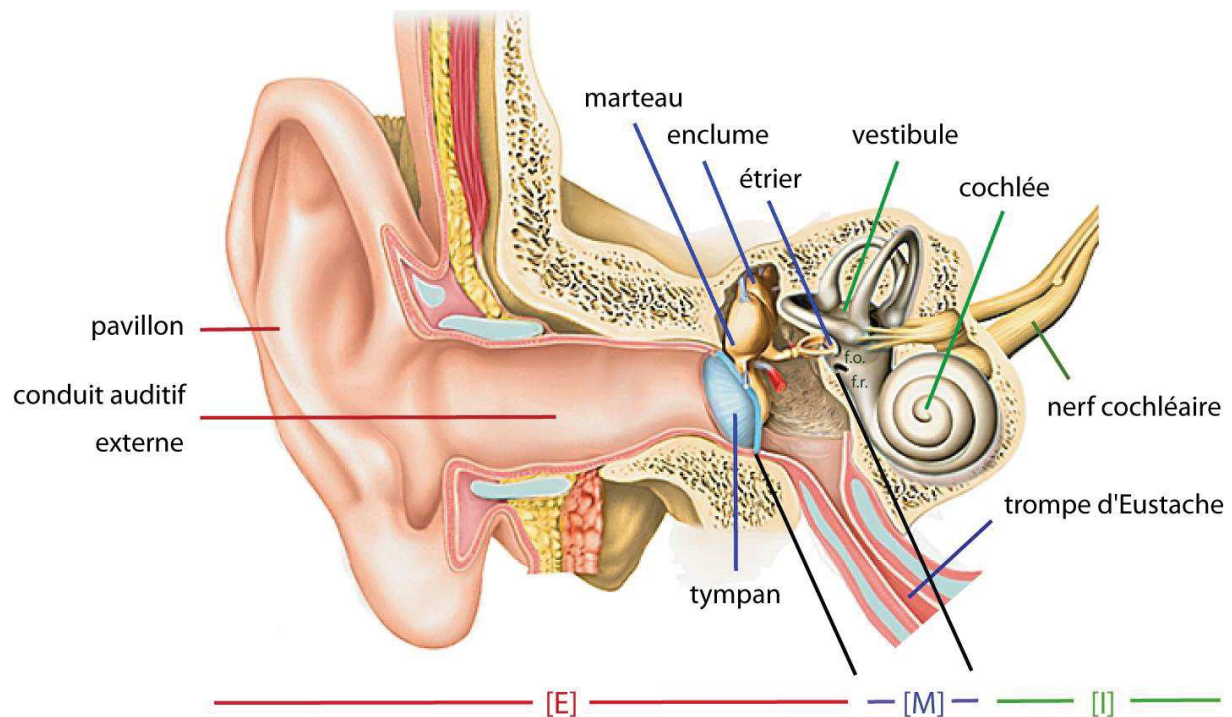
## 2. Rappels

### 2.1. Le système auditif périphérique

Nous entendons un son lorsque des vibrations de l'air ambiant, atteignant notre tympan, le mettent en mouvement dans des conditions d'amplitude et de fréquence telles que cette stimulation mécanique induit une sensation auditive. L'amplitude des vibrations acoustiques est mesurée en décibel, avec un niveau de pression acoustique de référence de 20  $\mu$ Pa lorsque cette amplitude est exprimée en dB Sound Pressure Level (dB SPL). La fréquence représente le nombre de vibrations acoustiques par seconde. Elle est mesurée en Hertz (Hz) et définit la hauteur des sons : plus la fréquence de la vibration est faible, plus le son est grave, et inversement, plus la fréquence de vibration est élevée, plus le son est aigu. Les mammifères disposent d'une audition dont la gamme fréquentielle couvre environ 10 octaves et dont la dynamique en intensité est d'environ 100 dB dans la zone de meilleure sensibilité. Pour collecter et transformer ces sons, l'oreille des mammifères est constituée de trois parties (**Figure 2.1**) : l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne, ayant chacune des rôles bien définis.

#### 2.1.1. L'oreille externe

L'oreille externe est constituée du pavillon et du conduit auditif externe. Elle est limitée par une membrane souple, le tympan, qui la sépare de l'oreille moyenne (**Figure 2.1**). L'oreille externe se comporte comme une antenne acoustique : le pavillon, associé au volume crânien, diffracte les ondes sonores et les canalise vers le conduit auditif externe. Cet ensemble assure une protection mécanique du tympan et joue un rôle de résonateur qui modifie sélectivement l'amplitude et la phase des ondes acoustiques. Ces modifications, qui sont particulières à chaque fréquence et à chaque angle d'incidence des ondes sonores, caractérisent la fonction de transfert de l'oreille externe. Chez l'homme, pour l'azimut 45° dans le plan horizontal, le gain acoustique induit à 3 kHz est de l'ordre de 20 dB. Contrairement à certains animaux, l'homme doit tourner toute la tête pour orienter ses pavillons. Leur implantation et leur relief participent cependant à des mécanismes monauraux de localisation des sources sonores. Légèrement dirigés vers l'avant, ils permettent de distinguer les sons issus d'une source située droit devant de ceux issus d'une source située droit derrière.



**Figure 2.1: L'organe périphérique de l'audition.** Le système auditif périphérique permet la transformation des vibrations sonores en un système bioélectrique interprétable par le système nerveux central. Ce système est constitué de trois compartiments : l'oreille externe (E), l'oreille moyenne (M) et l'oreille interne (I). L'oreille externe est constituée du *pavillon* et du *conduit auditif externe*. Elle est limitée par une membrane souple, le *tympan*, qui la sépare de l'oreille moyenne. L'oreille moyenne comprend une chaîne de trois osselets : le *marteau*, l'*enclume* et l'*étrier*. Elle communique avec le milieu extérieur via la *trompe d'Eustache* qui assure l'équilibre de pression de part et d'autre du tympan. L'oreille interne est constituée du *vestibule*, organe de l'équilibre, et de la *cochlée*, organe de l'audition. La cochlée est enroulée dans une paroi osseuse, avec deux ouvertures vers l'oreille moyenne : la fenêtré ovale (*f.o.*) et la fenêtré ronde (*f.r.*). Ces fenêtrés sont fermées par une membrane, avec un contact permanent de la plaque de l'étrier sur la membrane de la fenêtré ovale. Dessin Michel Saemann - Archives Larousse.

### 2.1.2. L'oreille moyenne

L'oreille moyenne est une cavité aérienne située entre l'oreille externe et l'oreille interne (**Figure 2.1**). Cette caisse tympanique est fermée sur l'oreille externe par la membrane du tympan, et sur l'oreille interne par l'intermédiaire des fenêtrés ronde et ovale. Elle communique avec le milieu extérieur via la trompe d'Eustache qui assure l'équilibre de pression de part et d'autre du tympan. L'oreille moyenne joue un double rôle de transmission et de protection. Lorsque le tympan vibre sous l'action des variations de pression transportées par l'onde sonore, il met en mouvement trois os (le marteau, l'enclume et l'étrier). Cette chaîne ossiculaire se comporte comme un levier

qui transforme les oscillations du tympan en un mouvement de piston de la plaque de l'étrier dans la fenêtré ovale. Le rapport des surfaces tympan/fenêtré ovale ( $>20/1$ ) permet une amplification qui assure le transfert des pressions acoustiques entre le milieu aérien et le milieu liquidien de l'oreille interne. L'oreille moyenne est donc un adaptateur d'impédance sans lequel une très grande partie de l'énergie acoustique serait perdue.

L'oreille externe joue également un rôle protecteur contre les sur-stimulations acoustiques. Les deux muscles de la chaîne tympano-ossiculaire (le muscle tenseur du tympan, situé sur le marteau, et le muscle de l'étrier) se contractent par voie réflexe lorsque l'oreille est soumise à un niveau sonore supérieur à 70 dB. En augmentant la rigidité du système, cette contraction réduit essentiellement la transmission des sons de fréquence inférieure à 1000-2000 Hz, avec une atténuation du niveau sonore d'environ 10 dB. Toutefois, le changement d'impédance mécanique produit par la contraction des muscles débute avec une latence de 20 à 40 ms et n'atteint son maximum qu'après 90 à 100 ms. De plus, le muscle de l'étrier se relâche par fatigue après quelques minutes. Ainsi ce réflexe, dit stapédien, est inefficace contre les bruits impulsionnels et les bruits de longue durée.

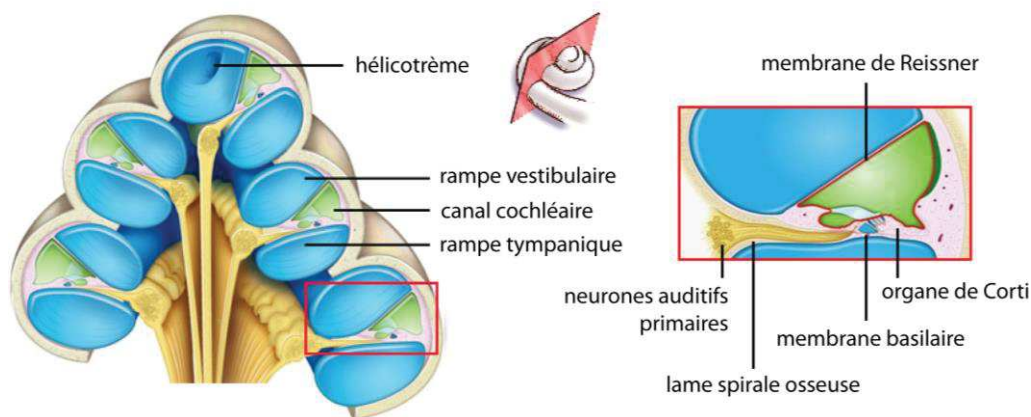
### 2.1.3. L'oreille interne

L'oreille interne renferme les organes de l'équilibre (le vestibule) et de l'audition (la cochlée). L'organe de l'audition assure la conversion du signal provenant de l'oreille moyenne en un signal électrique qui est ensuite véhiculé par le nerf auditif jusqu'au cortex.

La cochlée est recouverte d'une paroi osseuse présentant deux ouvertures vers l'oreille moyenne : la fenêtré ovale et la fenêtré ronde (**Figure 2.1**). La fenêtré ovale est fermée par une membrane en contact permanent avec la plaque de l'étrier. Elle transmet donc les vibrations mécaniques des osselets aux liquides de l'oreille interne. La fenêtré ronde joue le rôle de membrane d'expansion pour le liquide de l'oreille interne : son élasticité absorbe les variations de volume induites par les mouvements de la fenêtré ovale.

Lorsque les liquides de l'oreille interne sont mis en mouvement par les vibrations de l'étrier, il se forme une onde propagée qui débute de la fenêtré ovale et croît le long de la membrane basilaire jusqu'à atteindre un maximum d'amplitude à une distance donnée. Le positionnement de ce point de résonance le long de la cochlée dépend de la fréquence de la vibration. Les basses fréquences de stimulation font entrer en résonance l'apex de la cochlée, où la membrane basilaire est plus large et plus fine, tandis que les hautes fréquences de stimulation font entrer en résonance la base de la cochlée, où la membrane basilaire est plus étroite et plus épaisse. Cette théorie de l'onde propagée (von Békésy, 1956) ne permet pas à elle seule d'expliquer la sélectivité en fréquence de la cochlée. Nous aborderons par la suite les mécanismes actifs améliorant la sélectivité fréquentielle de la membrane basilaire (2.2.2.1.).

Situé sur la membrane basilaire, l'organe de Corti (**Figure 2.2**), organe sensori-nerveux de la cochlée, est également affecté par ces déformations qui entraînent l'ouverture mécanique de canaux cationiques au niveau des cellules sensorielles. L'entrée d'ions potassique dans les cellules sensorielles engendre leur dépolarisation et permet la transduction de l'énergie vibratoire en énergie électrique.



**Figure 2.2: Coupe transversale de la cochlée.** La cochlée est formée de deux rampes et d'un canal, enroulés en spirale autour d'un axe osseux, le modiolus. La *rampe vestibulaire* et la *rampe tympanique*, remplies de périlymphe (*bleu*), communiquent entre elles par un petit orifice situé à l'apex de la cochlée, nommé *hélicotrème*. La rampe vestibulaire part de la fenêtré ovale jusqu'à l'apex de la cochlée, où débute la rampe tympanique jusqu'à la fenêtré ronde. Ces rampes sont disposées de part et d'autre du *canal cochléaire*. Ce dernier est rempli d'endolymphe (*vert*), un liquide particulièrement riche en potassium. Le canal cochléaire est séparé de la rampe vestibulaire par la *membrane de Reissner*, et de la rampe tympanique par la *membrane basilaire*. C'est sur cette membrane qu'est situé l'*organe de Corti*, organe sensori-nerveux de la cochlée, siège des cellules ciliées. Cet épithélium sensoriel est innervé par les *neurones auditifs primaires*. Dessin Stéphane Blatrix - site « Voyage au centre de l'audition ».

## 2.2. Organe sensori-nerveux de la cochlée

L'organe de Corti doit son nom à l'anatomiste Alfonso Corti, qui en fit la description détaillée en 1851. Organe sensori-nerveux de la cochlée, il est composé des cellules sensorielles (ou cellules ciliées), des fibres nerveuses qui leur sont connectées, et des structures annexes ou de support (**Figure 2.3**). Les compositions ioniques des divers compartiments cochléaires jouent un rôle important dans le bon fonctionnement de l'organe de Corti.

### 2.2.1. Les fluides cochléaires

La périlymphe et l'endolymphe diffèrent profondément par leur composition ionique. Alors que la périlymphe, riche en sodium et pauvre en potassium, a une composition voisine des autres liquides extra cellulaires, comme le liquide céphalo-rachidien ( $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  proches de l'équilibre électrostatique), l'endolymphe, pauvre en sodium, se caractérise par une surcharge en potassium. Cependant, au lieu d'un potentiel de diffusion du  $\text{K}^+$ , négatif, on mesure, dans l'endolymphe, un potentiel endolymphatique de +80 mV. Ce potentiel endocochléaire est la somme de deux potentiels : 1) un potentiel positif (120 mV), dû à une sécrétion active de  $\text{K}^+$  par la strie vasculaire, épithélium tapissant la paroi latérale osseuse du canal cochléaire (**Figure 2.3**) ; et 2) un potentiel négatif (- 40 mV) dû à la diffusion passive des ions  $\text{K}^+$  dans les cellules ciliées. L'activité des cellules sensorielles dépend de la concentration en potassium de l'endolymphe (Sewell, 1984; Rickheit et al., 2008).

#### 2.2.1.1. Gradient électrochimique du potassium

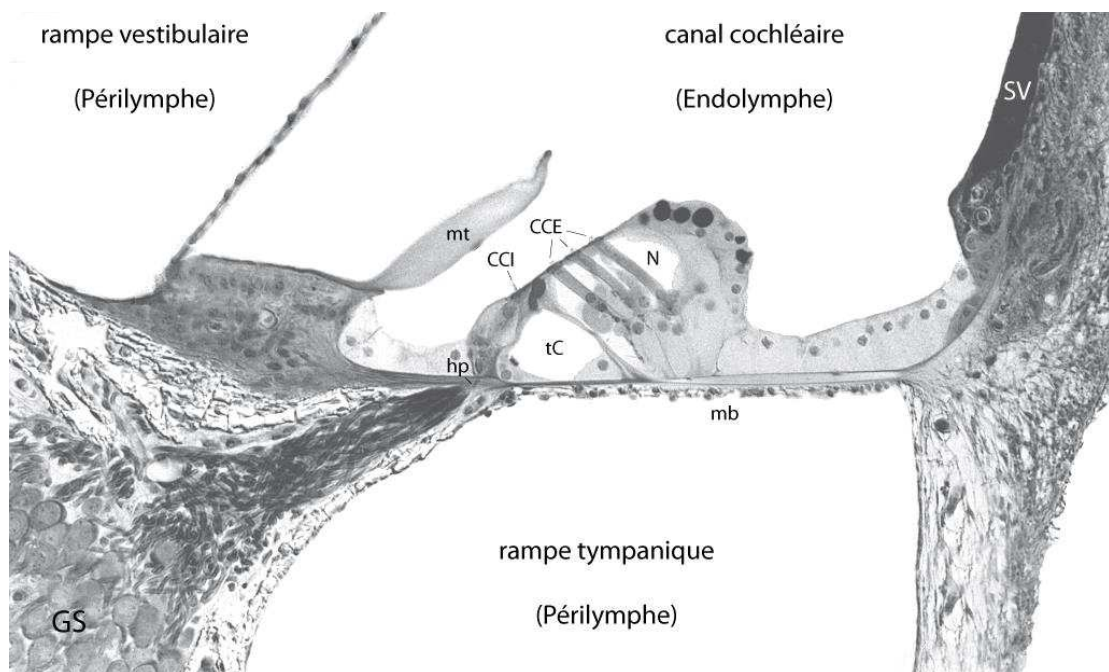
Il semble que la cochlée ait trouvé le moyen de faire entrer et sortir le potassium des cellules sensorielles sans dépense d'énergie. En règle générale, si un ion entre dans une cellule de manière passive, il sortira de manière active et vice versa.

Cependant, au niveau de l'organe de Corti, seul le pôle apical des cellules ciliées baigne dans l'endolymphe très riche en potassium (150 mM). Lorsque l'organe de Corti est mis en mouvement, le déplacement des cils des cellules sensorielles ouvre



les canaux cationiques sensibles à l'étirement. Avec un potentiel endocochléaire situé aux environs de +80 mV chez l'homme, et un potentiel de membrane des cellules ciliées situé entre -70 mV et -55 mV, l'ouverture mécanique des canaux cationiques entraîne une entrée passive et massive des ions potassiques (en surcharge dans l'endolymphe) dans les cellules ciliées. On comprend alors qu'une faible concentration en potassium de l'endolymphe aurait pour effet de limiter la dépolarisation, et donc l'activité des cellules sensorielles.

La sortie de ces ions potassiques se fait également de manière passive puisque leur concentration est plus grande à l'intérieur de la cellule ciliée (150 mM) qu'à l'extérieur de son corps cellulaire qui baigne dans la périlymphe (5 mM).



**Figure 2.3: Section transversale d'un tour de spire de la cochlée.** Coupe transversale effectuée au troisième tour d'une cochlée de cobaye visualisée en microscopie électronique à balayage. Cette image montre l'organe de Corti, situé entre la membrane basilaire (*mb*), la membrane de Reissner (*MR*) et la strie vasculaire (*SV*). Dans l'organe de Corti, se trouvent les cellules sensorielles, avec une rangée de cellules ciliées internes (*CCI*) et trois rangées de cellules ciliées externes (*CCE*), représentées de part et d'autre du tunnel de Corti (*tC*). La membrane tectoriale (*mt*), flottant dans l'endolymphe, coiffe les stéréocils des cellules ciliées. La *CCI* est entourée de cellules de soutien, alors que les *CCE*, ancrées sur leurs cellules de soutien, ont leurs membranes latérales en contact direct avec la corticolympe (peu différente de la périlymphe) qui remplit le tunnel de Corti (*tC*) et les espaces de Nuel (*N*). La partie apicale des cellules ciliées et celle des autres cellules annexes forment la lame réticulaire qui isole le compartiment endolympatique. Les fibres nerveuses gagnent ou quittent l'organe de Corti par l'habenule perforata (*hp*) au travers de la membrane basilaire. Les corps cellulaires des neurones auditifs primaires sont situés dans le ganglion spiral (*GS*). Image Marc Lenoir.



### 2.2.1.2. Importance de l'homéostasie potassique

La strie vasculaire force les ions  $K^+$  à passer du plasma sanguin dans l'endolymphe et les ions  $Na^+$  à passer de l'endolymphe dans le plasma, et ce en dépit de gradients de concentration défavorables. Différents acteurs sont impliqués dans ce transport actif. Leur rôle est important car la réduction du potentiel endocochléaire et/ou de la concentration potassique de l'endolymphe altère le fonctionnement des cellules ciliées (Sewell, 1984; Rickheit et al., 2008). À terme, l'affaissement de la membrane de Reissner entraîne la dégénérescence des cellules ciliées.

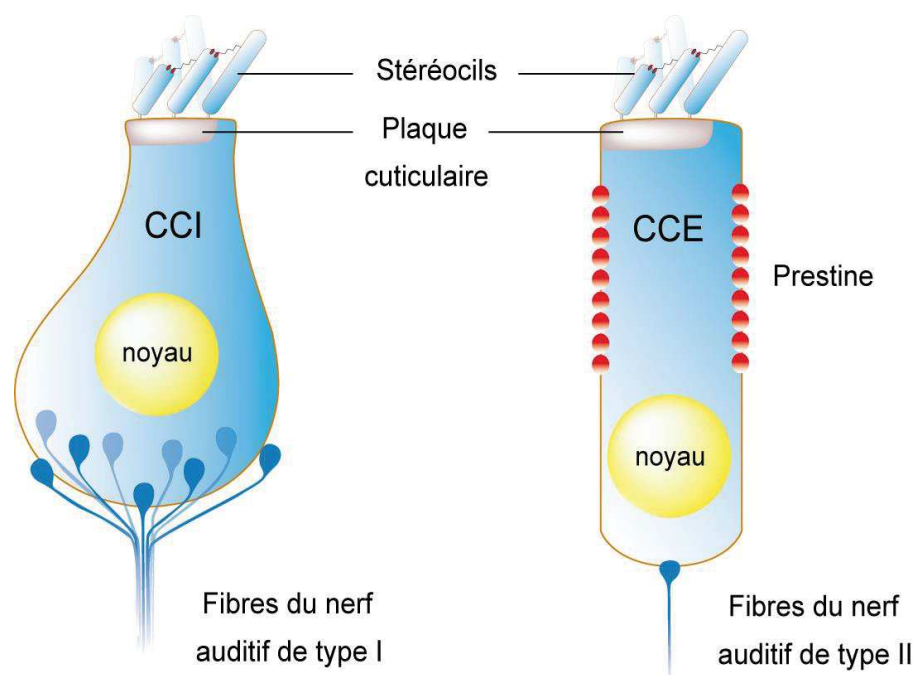
Par exemple, chez la souris, l'inactivation des gènes *KCNQ1/KCNE1* codant pour le canal potassique *KCNQ1* et sa sous-unité régulatrice *KCNE1*, entraîne une surdité associée à une absence de sécrétion de potassium dans l'endolymphe (Vetter et al., 1996; Lee et al., 2000; Letts et al., 2000; Casimiro et al., 2001). De même, l'inactivation du gène *SLC12A2* codant pour le co-transporteur  $Na^+-K^+-2Cl^-$  entraîne une surdité associée à une diminution de la sécrétion de potassium dans l'endolymphe (Delpire et al., 1999; Dixon et al., 1999; Flagella et al., 1999). L'importance de l'homéostasie potassique dans la cochlée est également mise en évidence par les études bloquant les pompes  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase par diffusion d'ouabaine dans les liquides cochléaires (Kuijpers et al., 1967; Konishi and Mendelsohn, 1970; Konishi and Salt, 1980; Marcus et al., 1981).

### 2.2.2. Les cellules sensorielles

La transduction des informations mécaniques en signaux électrochimiques est assurée par les cellules sensorielles. Ces dernières sont nommées cellules ciliées car leur pôle apical (plaque cuticulaire), en contact avec l'endolymphe, porte une centaine de stéréocils disposés en 3 ou 4 rangées de tailles croissantes (**Figure 2.4**). L'ensemble des stéréocils se comporte comme une unité fonctionnelle et se déplace donc de façon homogène (Kozlov et al., 2007). Ils sont reliés entre eux par de nombreux liens transversaux et par des liens terminaux (tip-links). Lorsque les vibrations d'une onde sonore sont communiquées aux liquides de l'oreille interne, le mouvement de la membrane basilaire crée une force de cisaillement qui déplace la membrane tectoriale en travers des stéréocils des cellules ciliées.

Au cours de leurs étirements périodiques, les liens apicaux qui relient les cils ouvrent des canaux cationiques mécano-sensibles : le potassium ( $K^+$ ) entre et la cellule est dépolarisée. Dans un même temps, un autre cation, le calcium ( $Ca^{2+}$ ) entre lui aussi.

Il existe deux types de cellules ciliées disposés de part et d'autre du tunnel de Corti. Les cellules ciliées externes (CCE), situées sur le bord externe de la spirale cochléaire, sont organisées en trois rangées (**Figure 2.3**). Dotées de propriétés contractiles, ces cellules augmentent l'amplitude et la sélectivité fréquentielle de la stimulation. Les cellules ciliées internes (CCI), situées sur le bord interne de l'organe de Corti, sont organisées sur une seule rangée (**Figure 2.3**). Elles sont responsables de la transduction mécano-électrique de l'information sonore.



**Figure 2.4: Représentation schématique des cellules ciliées.** Gauche : Cellule ciliée interne (CCI). Droite : Cellule ciliée externe (CCE). Les cellules ciliées sont dotées d'un faisceau de *stéréocils* qui détectent les ondes sonores. Les stéréocils sont ancrés dans la *plaque cuticulaire*, une structure riche en actine, et sont reliés entre eux par des filaments appelés *tip-link*. L'extrémité de ces derniers est connectée à un canal sensible à l'étirement. En réponse à une stimulation sonore, le canal mécano-transducteur s'ouvre et permet l'influx de cations, principalement du potassium et du calcium en raison de la composition de l'endolymphe. L'entrée de cations dépolarise alors les CCI et CCE. L'activité électro-motile de la CCE est assurée par la protéine *prestine*, située le long de sa membrane latérale. Tandis que 95% des fibres du nerf auditif sont connectées avec les CCI (fibres afférentes de type I), seul 5% des fibres projettent sur les CCE (fibres afférentes de type II) (Spendlin, 1969, 1972).

### 2.2.2.1. Rôle actif des cellules ciliées externes

D'un point de vue morphologique, les CCE ont une forme parfaitement cylindrique et leur longueur croît régulièrement de la base à l'apex de la cochlée. Le noyau des CCE est situé à la base des cellules (**Figure 2.4**), juste au-dessus du compartiment synaptique qui renferme de nombreuses mitochondries. Au pôle apical, les stéréocils des CCE sont disposés en W sur leur plaque cuticulaire, et la rangée la plus haute des stéréocils est liée à une structure amorphe recouvrant l'organe de Corti : la membrane tectoriale. Ce couplage est particulièrement ferme à la base de la cochlée où la rangée la plus haute des stéréocils est ancrée dans la membrane tectoriale. Les CCE reposent par leur base sur des cellules de soutien, les cellules de Deiters, et sont séparées latéralement entre elles par les espaces de Nuel (**Figure 2.3**). Leurs membranes latérales sont donc libres d'échange avec la périlymphe, et leur structure, unique dans l'organisme, permet aux CCE de se contracter.

#### *Electromotilité des CCE :*

C'est sur des CCE dissociées que l'électromotilité a été découverte en montrant que les CCE se raccourcissent en réponse à une dépolarisation et à l'inverse s'allongent en réponse à une hyperpolarisation (Brownell et al., 1985). Ces changements de taille peuvent atteindre jusqu'à 4% de la longueur des CCE et peuvent suivre des fréquences de stimulation compatibles avec les fréquences audibles. La persistance de l'électromotilité après digestion des réseaux cytosquelettiques sous membranaire, par dialyse intracellulaire de trypsine, montre que les éléments moteurs responsables de l'électromotilité résident dans la membrane plasmique elle-même (Huang and Santos-Sacchi, 1994). Le clonage de la protéine prestine, par l'équipe du Pr. P. Dallos, a permis de découvrir la nature du moteur moléculaire à l'origine de l'électromotilité (Zheng et al., 2000). On considère aujourd'hui que la dépolarisation de la CCE (entrée de  $K^+$  au moment de la stimulation sonore) modifie la conformation de cette protéine transmembranaire.

À l'inverse des canaux ioniques sensibles au potentiel, la détection du potentiel transmembranaire est étroitement associée aux ions Cl<sup>-</sup> intracellulaires (Oliver et al., 2001). Le déplacement de ces anions de leurs sites de liaison à la prestine vers l'intérieur du cytoplasme serait responsable du raccourcissement de la protéine, et donc du raccourcissement de la CCE. À l'inverse, lorsque la CCE se repolarise, les anions se lient à la prestine, entraînant un allongement de la CCE. Ainsi, les CCE se contractent en phase avec les déplacements de la membrane basilaire, et augmentent les déplacements des structures qui entraînent l'excitation des CCI.

### *L'amplificateur cochléaire :*

Quand les CCE sont soumises à un courant alternatif allant jusqu'à 70 kHz, leurs parois se contractent et se décontractent bien cycle par cycle. Ainsi, l'électromotilité peut opérer à des fréquences très élevées et pourrait expliquer l'existence de l'amplificateur cochléaire pour l'ensemble des fréquences audibles. Associé à cette électromotilité, un phénomène d'inhibition latérale pourrait également participer à la sélectivité en fréquence. En effet, la contraction d'une CCE en réponse à un saut de potentiel dépolarisant entraîne l'hyperpolarisation de la CCE voisine (Zhao and Santos-Sacchi, 1999). L'invalidation du gène *Pres* entraîne une perte d'audition de 50 dB (Liberman et al., 2002), soit le gain octroyé par les mécanismes actifs, et une perte de la sélectivité en fréquence (Cheatham et al., 2004).

Pourtant, une interrogation demeure car la dépolarisation de la touffe ciliaire (site de la transduction) doit se propager aux parois latérales de la CCE. Or la constante de temps de la membrane plasmique des CCE, produit de sa résistance et de sa capacité membranaire, fait que cette membrane se comporte comme un filtre "passe-bas", c'est-à-dire qu'elle ne laisse passer sans déformation que des fréquences électriques inférieures à 1 kHz. Il y a là un véritable paradoxe, puisque l'électromotilité apparaît durant l'évolution chez les mammifères, quand l'organe auditif devient sensible aux sons de haute fréquence. Or, elle ne pourrait agir qu'à basse fréquence à cause de la contrainte imposée par la constante de temps de la membrane. Plusieurs hypothèses ont été proposées afin de concilier les propriétés de la membrane plasmique et l'électromotilité des CCE, comme des potentiels extracellulaires pouvant gouverner la dépendance au voltage de la prestine (Oesterle and Dallos, 1986), ou

un potentiel de membrane aux environs de -40 mV pour les CCE, permettant une réduction de la constante de temps membranaire (Johnson et al., 2011).

Au cours des années, une hypothèse alternative a été proposée, plaçant l'amplificateur dans la touffe ciliaire. Cette hypothèse repose sur l'observation de mouvements spontanés et de mouvements actifs de la touffe ciliaire (Crawford and Fettiplace, 1985; Howard and Hudspeth, 1987; Denk and Webb, 1992; Benser et al., 1996; Martin and Hudspeth, 1999). En réponse à une stimulation mécanique, la déflexion initiale des stéréocils s'accompagne par un déplacement supplémentaire des stéréocils dans la direction du stimulus (Kennedy et al., 2005). A l'inverse de la membrane plasmique des CCE, le déplacement des stéréocils ne se comporte pas comme un filtre passe-bas et peut donc suivre chaque cycle de stimulation sonore de plusieurs dizaines de kHz. La force exercée par les stéréocils pourrait donc être à la base des mécanismes actifs (voir (Fettiplace and Hackney, 2006) pour revue).

Quoi qu'il en soit, les CCE sont indispensables à la fonction d'amplification cochléaire (Dallos and Harris, 1978). Cette amplification justifie : 1) la grande sensibilité de l'oreille interne : le gain obtenu par le mécanisme d'amplification est de 100 à 1000 en pression, c'est-à-dire de 40 à 60 dB, 2) la non-linéarité de l'amplification cochléaire, avec une efficacité des CCE qui baisse quand le niveau sonore augmente, et 3) la grande sélectivité fréquentielle de la cochlée : chaque cellule ciliée répondant préférentiellement à une fréquence donnée. Etant donné que les CCE assurent un meilleur couplage entre la membrane basilaire et la membrane tectoriale à la base de la cochlée (stéréocils ancrés dans la membrane tectoriale), les mécanismes actifs sont surtout efficaces pour les fréquences aiguës. Les fréquences graves sont donc moins bien discriminées. Une manifestation *in vivo* des mécanismes actifs est l'existence des oto-émissions acoustiques.

### *Les oto-émissions acoustiques :*

Reflet de l'électromotilité des CCE, les oto-émissions acoustiques (OEA) sont des émissions sonores de la cochlée. Ces sons se propagent par voie rétrograde vers la fenêtre ovale, puis à travers l'oreille moyenne et le conduit auditif externe où on peut les enregistrer au moyen d'un microphone. Leur présence témoigne de l'intégrité des

CCE. Si les CCE sont absentes ou lésées, une surdité allant jusqu'à 50 dB sera combinée à une mauvaise sélectivité en fréquence et à l'absence d'OEA.

Les OEA provoquées par une stimulation sonore peuvent être enregistrées à l'aide d'une sonde placée dans le conduit auditif externe. Intégrés à cette sonde, un haut-parleur envoie un son stimulant très bref et un microphone recueille les OEA émises par les CCE. Les OEA apparaissent sous forme d'une oscillation prolongée. Sur un sujet normo-entendant, leur seuil de détection est très bas (souvent inférieur au seuil de perception).

La recherche d'OEA provoquées constitue un test simple, non invasif, rapide, objectif et spécifique de l'intégrité des CCE. Ce test est devenu un classique de l'exploration fonctionnelle en ORL, notamment dans le cadre du dépistage d'un problème de surdité cochléaire chez le nouveau-né.

### *Les produits de distorsion acoustique :*

Les produits de distorsion acoustique (PDA) forment une catégorie d'otoémissions provoquées. Cette catégorie requiert l'envoi simultané dans le conduit auditif externe de deux sons purs de fréquences  $f_1$  et  $f_2$  proches (conventionnellement,  $f_2 > f_1$ ) et de niveaux  $L_1$  et  $L_2$ , soit égaux, soit légèrement asymétriques ( $L_1 > L_2$ ). Les CCE sont la cible de l'investigation par PDA. Ces cellules ciliées amplifient les sons dont la fréquence est proche de leur fréquence de résonance, et comme leurs stéréocils ont un mouvement qui distord l'onde acoustique au voisinage de cette fréquence, le fait de recevoir deux fréquences  $f_1$  et  $f_2$  leur fait engendrer des PDA aux fréquences combinaisons entières de  $f_1$  et  $f_2$ . Le PDA correspondant à  $2f_1 - f_2$  est le plus ample chez l'homme et à ce titre, le plus facile à mettre en évidence. Sa recherche est devenue un test clinique de la fonctionnalité des CCE dans la région codant pour  $f_2$ .

### *2.2.2.2. Transfert de l'information par les cellules ciliées internes*

Les CCI se distinguent des CCE par la forme en poire de leur corps cellulaire (**Figure 2.4**). Au nombre de 3500 par cochlée chez l'homme, les CCI sont situées sur le bord interne de l'organe de Corti et sont organisées sur une seule rangée. Contrairement aux CCE, les stéréocils sont disposés en ligne et ne sont pas ancrés dans la membrane tectoriale. Le noyau est en position médiane et la membrane plasmique latérale est classique. Bien que trois fois moins nombreuses que les CCE, les CCI sont les véritables cellules sensorielles. Elles assurent à la fois la transduction de la vibration mécanique en signal électrique et le transfert de l'information par la libération de neurotransmetteur vers les neurones auditifs primaires (Moser and Beutner, 2000; Glowatzki and Fuchs, 2002).

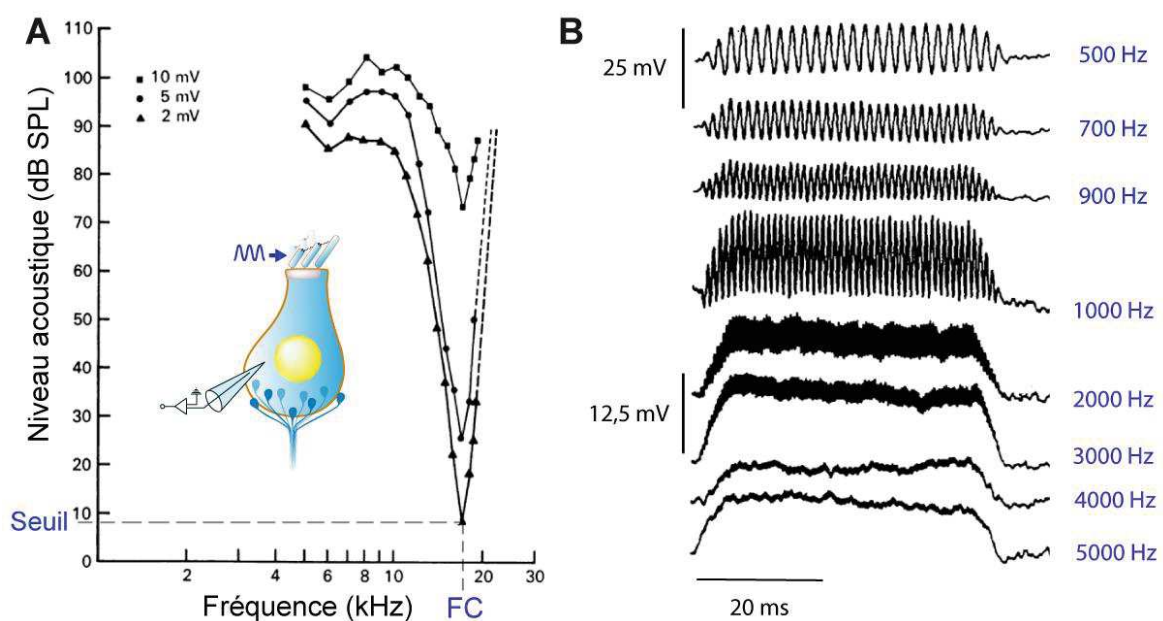
De la même façon que pour les CCE, chaque CCI répond préférentiellement à une fréquence donnée. Les stéréocils des CCI n'étant pas ancrés à la membrane tectoriale, leur déflexion est favorisée par le contact direct avec la bande de Hensen de la membrane tectoriale. L'ouverture des canaux mécano-sensibles des stéréocils entraîne l'entrée de potassium dans la cellule. La dépolarisation de la CCI provoque l'ouverture de canaux calciques sensibles au potentiel, situés au voisinage des zones actives (Platzner et al., 2000; Brandt et al., 2003; Zenisek et al., 2003; Neef et al., 2009). L'influx de calcium entraîne la libération dans la fente synaptique du neurotransmetteur des CCI: le glutamate (Issa and Hudspeth, 1994; Parsons et al., 1994; Tucker and Fettpiace, 1995; Issa and Hudspeth, 1996; Moser and Beutner, 2000; Zenisek et al., 2003; Frank et al., 2009; Meyer et al., 2009).

### *2.2.2.3. Potentiels de récepteur des cellules ciliées*

En fonction de la fréquence et de l'intensité de la stimulation acoustique, il y a modulation de la dépolarisation des cellules sensorielles et naissance d'un potentiel intracellulaire, aussi appelé potentiel de récepteur. Cette réponse électrique à une stimulation acoustique peut être enregistrée grâce à une électrode placée



directement dans la cellule. Les premiers enregistrements effectués (Russell and Sellick, 1978) ont constitué une étape importante dans la compréhension de la physiologie de l'audition. Ces enregistrements ont notamment révélé l'étroite sélectivité fréquentielle des CCI (**Figure 2.5A**). Le potentiel de récepteur des cellules ciliées présente deux composantes : une composante alternative (AC) qui suit la fréquence de stimulation, et une composante continue (DC) qui reproduit l'enveloppe de la stimulation acoustique.



**Figure 2.5 : Potentiels de récepteur d'une cellule ciliée interne.** **A** : Sélectivité fréquentielle d'une cellule ciliée interne (enregistrements intracellulaires chez le cochon d'inde). Courbes iso-réponses intensité-fréquence représentant le niveau d'intensité nécessaire, en fonction de la fréquence de stimulation, pour obtenir un potentiel de récepteur (composante continue) de 2 mV, 5 mV, et 10 mV. La fréquence de meilleure sensibilité de cette CCI (fréquence caractéristique: FC) est 17 kHz, avec un seuil de réponse estimé à 8 dB SPL pour un potentiel de récepteur de 2 mV (Russell and Sellick, 1978). **B** : Potentiels de récepteur d'une CCI en réponse à des ondes sonores de différentes fréquences. Au-delà de 1 kHz, la composante alternative diminue tandis que la composante continue augmente (Russell and Sellick, 1983).

Les composantes alternatives et continues dépendent de la fréquence de stimulation et du type de cellule ciliée (CCE vs CCI). La composante alternative est plus importante dans les CCE que dans les CCI, tandis que la composante continue est prépondérante dans les CCI. D'autre part, l'amplitude de la composante continue croît avec la fréquence, tandis que la composante alternative est majoritaire pour les



basses fréquences (Russell and Sellick, 1978). En effet, pour les fréquences de stimulation inférieures à 1 kHz, le potentiel de membrane se dépolarise en fonction du déplacement des stéréocils. À chaque déflexion des stéréocils (en phase avec l'onde sonore), la CCI se dépolarise et libère du glutamate. Au-delà de 1 kHz, la constante de temps membranaire empêche la membrane plasmique de suivre en phase les cycles de la stimulation : la composante continue (DC) est alors prédominante et les CCI codent l'enveloppe de la stimulation sonore. Les composantes alternatives (AC) et continues (DC) du potentiel de récepteur intracellulaire sont à la base des potentiels globaux sensoriels, que sont les potentiels microphoniques et de sommation.

### 2.2.3. Les synapses à ruban des cellules ciliées

Chaque zone active d'une CCI se caractérise par une structure dense aux électrons appelée ruban synaptique (**Figure 2.6**, Nouvian et al., 2006). Les rubans synaptiques sont ancrés à la membrane plasmique et entourés d'une centaine de vésicules, lesquelles contiennent du glutamate, le neurotransmetteur des CCI.

#### 2.2.3.1. Organisation des synapses à ruban

Il y a un seul ruban par zone active et une dizaine à une vingtaine de zones actives par CCI. Chaque zone active est connectée par la terminaison d'un seul neurone auditif (Liberman, 1982). La topologie des synapses est intimement liée à la présence des rubans synaptiques.

La protéine Ribeye est l'unique protéine spécifique des rubans (environ 4000 molécules de Ribeye par ruban ; Zenisek et al., 2004). Elle est essentielle à leur formation (Schmitz et al., 2000). La surexpression de Ribeye entraîne la formation de rubans ectopiques et son absence provoque une désorganisation des synapses afférentes, associée à une dégradation du transfert synaptique (Wan et al., 2005; Sheets et al., 2011). La protéine Bassoon ancre les rubans à la membrane plasmique. L'invalidation du gène qui code pour Bassoon entraîne une réduction de 80% des rubans ancrés à la membrane (Dick et al., 2003; Khimich et al., 2005; Buran et al., 2010; Frank et al., 2010). La perte des rubans à la membrane est associée à une réduction massive de l'exocytose et des courants calciques aux zones actives.

Les synapses à rubans sont concentrées au pôle baso-latéral des CCI avec une distance inter-synapse de 2  $\mu\text{m}$  (Meyer et al., 2009). Parmi le nombre total de rubans contenus dans une cellule, 5% sont localisés dans le cytoplasme (rubans flottants cytoplasmique) et reflètent probablement le recyclage des rubans à la membrane. Cependant, les rubans synaptiques sont relativement immobiles sur plusieurs minutes (entre 0,35 et 13,5 nm/sec; Zenisek et al., 2004). L'analyse ultrastructurale des CCI montre 4 types de vésicules (**Figure 2.6**): 1) des vésicules cytoplasmiques dont le déplacement est aléatoire (Holt et al., 2004), 2) des vésicules liées aux rubans à une distance de 25 nm, 3) des vésicules arrimées à la membrane et liées aux rubans - environ 20 vésicules synaptiques par ruban - et 4) des vésicules arrimées uniquement à la membrane plasmique (Lenzi et al., 1999, 2002).

L'entrée de calcium provoque la fusion des vésicules à la membrane et la libération du glutamate dans la fente synaptique. Les canaux calciques de type L des CCI sont exclusivement formés de la sous-unité Cav1.3 en association avec la sous-unité auxiliaire  $\beta 2$  (Platzer et al., 2000; Brandt et al., 2003; Sidi et al., 2004; Neef et al., 2009). Une mutation du gène codant pour la sous-unité Cav1.3 est responsable d'une surdité associée à une bradycardie (Baig et al., 2011). La distribution des canaux calciques Cav1.3 à la membrane plasmique est assurée par la protéine Harmonine, dont la perte de fonction est à l'origine du syndrome de Usher 1C (perte de vision et surdité ; Gregory et al., 2011). L'observation des canaux calciques en microscopie super-résolutive a montré que ces derniers étaient organisés chez les CCI adultes sous la forme de bande, en dessous du ruban synaptique (Frank et al., 2010; Wong et al., 2014).

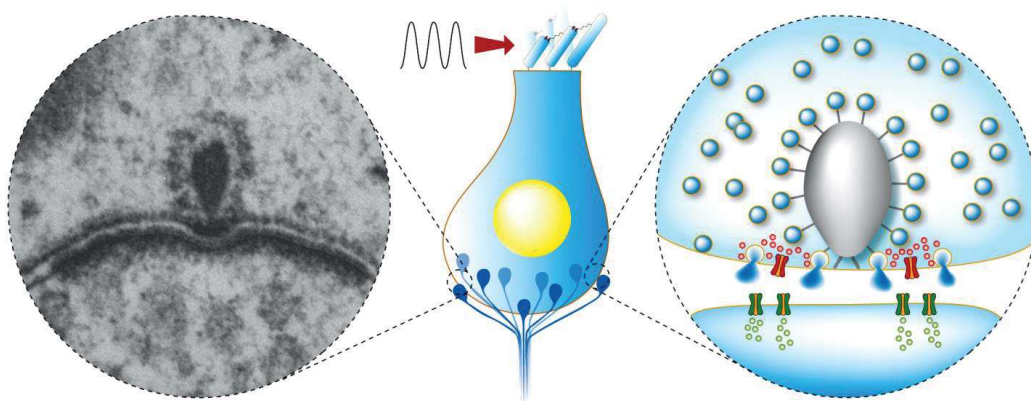
L'Otoferline, à l'origine d'une surdité non-syndromique DFNB9 (Yasunaga et al., 1999), est fortement exprimée par les CCI. L'Otoferline se caractérise par 6 domaines C2 (domaines fixant le calcium) et serait le détecteur calcique de l'exocytose (Roux et al., 2006). Enfin, l'Otoferline, qui interagit avec les protéines Rab8 et Myosin VI (Heidrych et al., 2008; Roux et al., 2009), réapprovisionne les vésicules synaptiques aux zones actives (Pangrsic et al., 2010; Pangršič et al., 2012).

Vglut3 est l'unique transporteur vésiculaire du glutamate des CCI (Obholzer et al., 2008; Ruel et al., 2008; Seal et al., 2008). Une mutation du gène *SLC17A8* codant

Vglut3 est à l'origine d'une surdité non-syndromique DFNA25. La souris dont le gène *Slc17a8* a été invalidé présente une surdité sévère (qui provient de l'absence de glutamate intra-vésiculaire). À l'inverse, la surdité observée chez les patients DFNA25 est progressive. Ces résultats indiquent que la souris sans Vglut3 ne reproduit pas la surdité DFNA25 et appelle à l'étude de la souris porteuse de la mutation humaine A211V.

### 2.2.3.2. Exocytose rapide et soutenue dans le temps

L'entrée de calcium provoque la fusion des vésicules à la membrane et la libération du glutamate dans la fente synaptique. En l'absence de stimulation sonore, le mouvement brownien des stéréocils (Jaramillo and Wiesenfeld, 1998) maintient le potentiel de membrane des CCI à des valeurs correspondantes à l'activation des courants calciques (Johnson et al., 2011). La libération continue de glutamate qui en résulte est à l'origine de l'activité spontanée des fibres du nerf auditif. En réponse à une stimulation sonore, la CCI se dépolarise, ce qui augmente la probabilité d'ouverture des canaux calciques. L'augmentation d'amplitude des entrées calciques aux zones actives se traduit par une augmentation de la fréquence des courants excitateurs post-synaptiques (Glowatzki and Fuchs, 2002).



**Figure 2.6 : Transduction des cellules ciliées internes.** En réponse à une onde sonore, la dépolarisation de la cellule ciliée interne ouvre les canaux calciques (rouge), situés à proximité des zones actives. Ces dernières se caractérisent par un ruban synaptique (gris), ancré à la membrane plasmique et entouré d'un halo de vésicules synaptiques. L'élévation de calcium intracellulaire (points rouges) provoque l'exocytose des vésicules synaptiques et la libération du glutamate dans la fente synaptique. L'activation des récepteurs au glutamate (vert) est associée aux courants excitateurs post-synaptiques. Le message nerveux est véhiculé jusqu'au noyau cochléaire du tronc cérébral via les neurones auditifs primaires. (Gauche, observation en microscopie électronique à transmission)

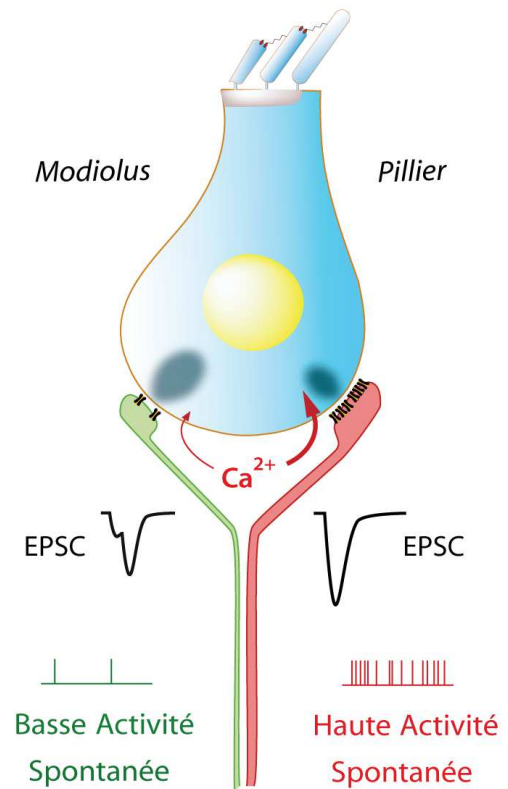
Les synapses à ruban des cellules sensorielles auditives assurent une libération rapide du neurotransmetteur. Cette libération peut durer dans le temps et suivre cycle par cycle une stimulation de 2 kHz. L'utilisation de tampons calciques a permis de distinguer deux contingents de vésicules synaptiques associés à la libération du neurotransmetteur. Un premier contingent est associé à la fusion rapide ( $\sim 9$  ms) d'un nombre limité de vésicules synaptiques (moins de 50 vésicules par synapse) probablement liées au ruban synaptique et arrimées à la membrane plasmique (*RRP*, pour *Readily Releasable Pool*). Le second contingent correspond à une fusion vésiculaire soutenue dans le temps avec 9000 vésicules/sec (*SRP*, pour *Slowly Releasable Pool*). Cette seconde composante pourrait refléter la fusion de vésicules éloignées des canaux calciques et/ou le réapprovisionnement des vésicules aux zones actives (Moser and Beutner, 2000; Johnson et al., 2005; Schnee et al., 2005; Rutherford and Roberts, 2006; Goutman and Glowatzki, 2007; Li et al., 2009). Suite à l'identification du contingent de vésicules dont la libération est rapide, il a été proposé que la déplétion de ces vésicules soit à l'origine de l'adaptation rapide des fibres du nerf auditif (Moser and Beutner, 2000).

### 2.2.3.3. Hétérogénéité des synapses

Il existe une forte hétérogénéité de l'amplitude des influx calciques entre les synapses d'une seule CCI. Cette hétérogénéité provient de la variation du nombre de canaux calciques aux différentes synapses d'une seule CCI (Frank et al., 2009). Il a été proposé que les variations d'amplitude des entrées calciques soient responsables des différents taux de décharge des fibres du nerf auditif (Frank et al., 2009; Meyer et al., 2009). Une synapse dont l'influx calcique est élevé entraînerait une fusion massive de vésicules et favoriserait la génération de potentiels d'action au sein la fibre afférente. À l'inverse, une entrée calcique de faible amplitude provoquerait une exocytose limitée et une activité réduite de la fibre afférente. Ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi les fibres innervant une même CCI (même potentiel de membrane) peuvent présenter différentes activités spontanées. Il est également cohérent avec les propriétés de codage des fibres auditives. En effet, les fibres à haute activité spontanée sont les plus sensibles aux bas niveaux de stimulation et leur activité est

saturée à plus hauts niveaux. Les fibres à basse activité spontanée, moins sensibles, assurent le codage des plus hauts niveaux de stimulation. La mise en jeu de ces différentes fibres permettrait le codage de l'intensité sonore pour une dynamique de 100 dB. D'autres différences morphologiques sont associées à ces différentes fibres (**Figure 2.7**).

**Figure 2.7 : Hétérogénéité des synapses à rubans et conséquences physiologiques.** L'amplitude des influx calciques (flèches rouges) pourrait déterminer l'activité spontanée des fibres du nerf auditif. D'autre part, la forme et les cinétiques d'activation des courants excitateurs post-synaptiques (EPSC, en noir) seraient à l'origine des différents taux de décharge des fibres du nerf auditif. Les fibres à basse activité spontanée et à haut seuil se caractérisent par des densités post-synaptiques de surface réduite et un petit diamètre. Elles sont connectées à des rubans synaptiques de grande taille. À l'inverse, les fibres à haute activité spontanée et à bas seuil ont des densités post-synaptiques étendues, un gros diamètre et elles sont connectées à des rubans compacts de petite taille (Lieberman et al., 2011). Cependant, l'hétérogénéité des influx calciques n'est pas distribuée selon un axe modiolus - pilier, à l'inverse de la forme des rubans, des surfaces des densités post-synaptiques et de l'activité des fibres du nerf auditif (Meyer et al., 2009).



Une hypothèse alternative implique la forme des courants excitateurs post-synaptiques (Grant et al., 2010). En effet, l'enregistrement en patch-clamp de l'activité d'un bouton afférent montre une forte variabilité de l'amplitude des courants excitateurs post-synaptiques avec des cinétiques d'activation et d'inactivation homogène (Glowatzki and Fuchs, 2002). Ces résultats s'expliquent par une libération coordonnée dans le temps de plusieurs vésicules synaptiques (libération multi-vésiculaire). Les courants post-synaptiques dont la forme est monophasique (activation rapide - 0,5 ms) seraient associés à des fibres à haute activité spontanée. Tandis que les courants multiphasiques (activation lente - 1 ms) seraient associés aux fibres à basse activité spontanée (Grant et al., 2010).

## 2.3. Neurones cochléaires

### 2.3.1. Innervation de l'organe de Corti

L'organe de Corti reçoit une double innervation, à la fois afférente et efférente (**Figure 2.8**). L'innervation afférente provient des neurones auditifs primaires, dont les corps cellulaires sont situés au niveau du ganglion spiral. Les neurones auditifs primaires sont des neurones bipolaires. Leur prolongement périphérique se termine dans l'organe de Corti, au contact des cellules ciliées, et leur prolongement central se termine dans les noyaux cochléaires du tronc cérébral. On distingue les neurones ganglionnaires de type I et les neurones ganglionnaires de type II, innervant respectivement les CCI et les CCE. L'innervation efférente provient de deux systèmes dont les corps cellulaires sont originaires de l'olive bulbaire. Le système efférent médian innerve directement les CCE, tandis que le système efférent latéral innerve les dendrites des fibres afférentes connectées aux CCI.

#### 2.3.1.1. Innervation des cellules ciliées externes

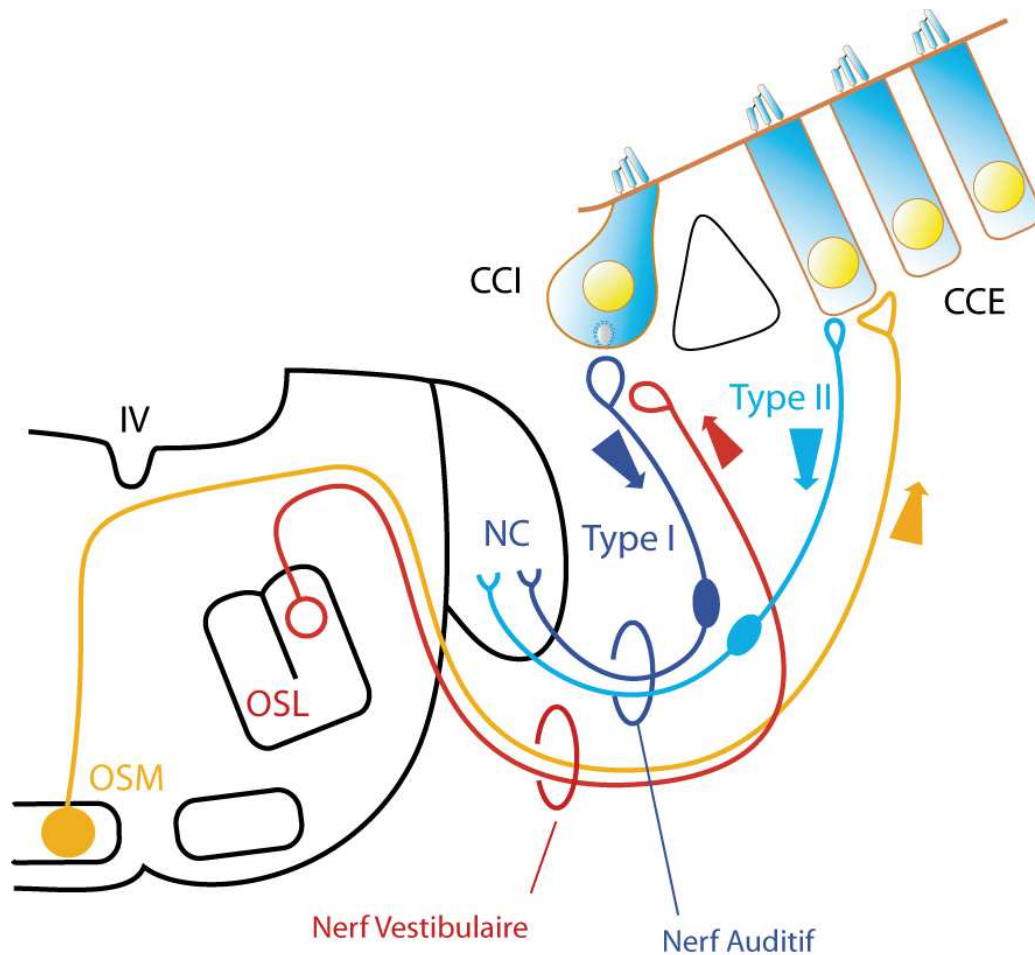
##### *Innervation afférente :*

L'innervation afférente des CCE est assurée par les neurones ganglionnaires de type II (**Figure 2.8**). Ces derniers représentent une population minoritaire au sein du ganglion spiral: ils constituent à peine 5% de la population neuronale de cette structure (Spoendlin, 1969, 1972).

Le diamètre et la surface du corps cellulaire des neurones de type II sont plus petits que ceux des neurones de type I, et contrairement à ces derniers ils ne sont pas myélinisés (Kiang et al., 1982). Le prolongement périphérique de ces neurones est ramifié. Chaque neurone de type II va ainsi établir des synapses avec une dizaine de CCE différentes, appartenant généralement à la même rangée. Récemment, la nature glutamatergique de ces synapses a été démontrée par l'enregistrement des terminaisons des fibres de type II (Weisz et al., 2012). En accord avec ces résultats, les CCE sont dotées de rubans présynaptiques (Knirsch et al., 2007).



Cependant, le rôle de l'innervation afférente des CCE reste controversé. Les neurones de type II ne semblent pas répondre aux stimulations sonores à forte intensité (Robertson, 1984), malgré une sensibilité à l'ATP, connu pour être libéré lors de traumatisme sonore.



**Figure 2.8 : Innervation de l'organe de Corti.** Cette figure représente les connexions entre les cellules ciliées et le tronc cérébral. Les cellules ciliées internes (CCI) font synapse avec les neurones ganglionnaires de type I. Ces neurones forment le système afférent radial (représenté en bleu nuit) reliant la cochlée aux noyaux cochléaires (NC). Le système efférent latéral (représenté en rouge) est issu des neurones de l'olive supérieure latérale (OSL). Il innerve les dendrites des fibres afférentes connectées aux CCI. Les cellules ciliées externes (CCE) font synapse avec les neurones ganglionnaires de type II formant le système afférent spiral (représenté en bleu ciel). Les cellules ciliées externes sont directement innervées par le système efférent médian (représenté en jaune) dont les neurones proviennent du noyau ventro-médian du corps trapézoïde controlatéral, situé sur le pourtour du complexe olivaire supérieur médian (OSM).

### *Système efférent médian :*

L'innervation efférente des CCE est assurée par le système olivocochléaire efférent médian (**Figure 2.8**), appelé ainsi du fait de la présence des corps cellulaires des neurones dans le noyau ventro-médian du corps trapézoïde, sur le pourtour du complexe olivaire supérieur médian. Le contact entre les CCE et les neurones du système efférent médian s'effectue par l'intermédiaire de grosses terminaisons axoniques. Le neurotransmetteur utilisé par le système efférent médian est l'acétylcholine (Bobbin and Konishi, 1971; Housley and Ashmore, 1991; Kujawa et al., 1993; Erostequi et al., 1994a; Kujawa et al., 1994; Blanchet et al., 1996; Oliver, 2000). Libérée par le système efférent médian, l'acétylcholine active des récepteurs nicotiques  $\alpha 9$  et  $\alpha 10$ . Ces sous-unités nicotiques confèrent aux récepteurs des CCE un profil pharmacologique particulier : ces récepteurs sont bloqués par la strychnine (antagoniste glycinergique), par la bicuculline (antagoniste gabaergique), par la nicotine et la muscarine (Fuchs and Murrow, 1992; Kujawa et al., 1993; Elgoyhen et al., 1994; Erostequi et al., 1994b; Kujawa et al., 1994; Elgoyhen et al., 2001). L'activation d' $\alpha 9$ - $\alpha 10$  par l'acétylcholine entraîne une entrée de calcium, qui à son tour active des canaux potassiques sensibles au calcium SK2 (Erostequi et al., 1994b; Blanchet et al., 1996; Evans, 1996; Yuhas and Fuchs, 1999; Oliver, 2000). Ces derniers assurent la sortie de potassium et par conséquent entraînent l'hyperpolarisation des CCE.

En contrôlant le potentiel de membrane des CCE, le système efférent médian module l'activité de ces cellules, dont le rôle majeur est d'amplifier l'intensité des ondes sonores. La réduction du gain de l'amplificateur cochléaire permet au système efférent médian d'assurer une protection aux fortes intensités de stimulation (Puel et al., 1988; Maison et al., 2003). Notons aussi que le système efférent médian est également activé lors de processus d'attention sélective, qu'elle soit visuelle ou auditive (Puel et al., 1988; Froehlich et al., 1990; Puel and Rebillard, 1990; Winter et al., 1990; Meric and Collet, 1992).



### 2.3.1.2. *Innervation des cellules ciliées internes*

#### *Innervation afférente :*

L'innervation afférente des CCI est assurée par les neurones ganglionnaires de type I (**Figure 2.8**) également appelés neurones auditifs primaires ou fibres afférentes radiales. Ces neurones représentent 95 % de la population neuronale du ganglion spiral (Spoendlin, 1969). Ce sont des neurones myélinisés de grosse taille. Ils possèdent une branche périphérique unique, elle aussi myélinisée jusqu'à l'entrée de l'organe de Corti, qui projette vers les CCI et vient se connecter par un seul bouton dendritique à une seule CCI (Kiang et al., 1982). Plusieurs neurones de types I vont contacter une même CCI (en moyenne une dizaine par CCI chez l'homme). Ainsi, chez l'homme, il existe environ 30000 neurones de type I pour 3500 CCI. Au niveau de la densité post-synaptique des fibres de type I du nerf auditif, les récepteurs au glutamate de type AMPA se distribuent en anneau, avec pour centre la projection du ruban synaptique (Matsubara et al., 1998; Meyer et al., 2009). Les récepteurs AMPA des fibres de type I sont exclusivement composés par les sous-unités GluR 2-3 (Matsubara et al., 1998; Khimich et al., 2005; Nouvian et al., 2006).

#### *Système efférent latéral :*

Les fibres du système efférent latéral contactent directement les dendrites des neurones de type I, juste sous le bouton synaptique formé avec la CCI (**Figure 2.8**). Ces fibres efférentes sont originaires de l'olive supérieure latérale située dans le tronc cérébral. Le système efférent latéral utilise plusieurs neurotransmetteurs dont l'acétylcholine, le GABA, la dopamine, et des neuromodulateurs dont le CGRP, les enképhalines et les dynorphines (Eybalin, 1993; Puel, 1995). Son rôle fonctionnel est peu connu, mais il semble modifier l'activité des fibres afférentes et pourrait protéger l'oreille d'une surexposition sonore (Darrow et al., 2007) et/ou équilibrer la sensibilité des deux oreilles (Darrow et al., 2006).

## 2.3.2. Neurones auditifs primaires

### 2.3.2.1. Morphologie

Les neurones auditifs primaires sont composés d'un axone périphérique, qui innerve une cellule ciliée interne, d'un corps cellulaire, localisé dans le ganglion spiral, et d'un axone central qui s'étend du corps cellulaire aux noyaux cochléaires. Les axones centraux convergent vers le modiolus pour former le nerf auditif. Les neurones issus de l'apex sont positionnés au centre du nerf alors que les neurones issus de la base sont distribués en périphérie. Les neurones qui innervent la base de la cochlée et qui codent les fréquences aiguës sont plus courts que les neurones qui innervent l'apex (~4 mm contre ~8 mm chez le chat). C'est la raison pour laquelle les corps cellulaires des neurones de l'apex sont plus volumineux (section longitudinale ~ 350  $\mu\text{m}^2$ ) et plus allongés (grand axe / petit axe ~ 0.8) que les neurones de la base (section longitudinale ~ 250  $\mu\text{m}^2$ ; grand axe / petit axe ~ 0.6) (Liberman and Oliver, 1984).

L'axone périphérique se distingue de l'axone central par sa longueur (10 à 20 fois plus courte, (Liberman and Oliver, 1984) et son plus petit diamètre (rapport des diamètres central/périphérie de l'ordre de 4 (Kiang et al., 1982; Liberman and Oliver, 1984). L'axone central et le corps cellulaire sont intégralement myélinisés, contrairement à l'axone périphérique qui est myélinisé uniquement du corps cellulaire à l'habenula perforata. Des mesures acquises chez le chat ont montré que l'axone périphérique compte 3 segments myélinisés de 150 à 200  $\mu\text{m}$  l'unité contre 7 à 12 segments myélinisés de 300 à 400  $\mu\text{m}$  l'unité pour l'axone central. Les segments myélinisés sont séparés par un nœud de Ranvier d'un micromètre de longueur et caractérisé par un rétrécissement du diamètre du neurone (Liberman and Oliver, 1984). Les nœuds de Ranvier qui bordent le corps cellulaire sont plus longs et peuvent atteindre une dizaine de micromètres de longueur. Le site d'initiation des potentiels d'action des neurones auditifs primaires est localisé dans la terminaison périphérique à proximité de l'habenula perforata (Siegel, 1992; Hossain et al., 2005; Rutherford et al., 2012).

Il a été montré que les caractéristiques morphologiques des neurones auditifs primaires pouvaient être reliées à leur activité spontanée. Un neurone à basse activité

spontanée est caractérisé par : i) une innervation de la CCI côté modiolus, ii) une faible densité de récepteurs post-synaptiques, iii) un petit diamètre axonal et iv) peu de mitochondries. Tandis qu'un neurone à haute activité spontanée est caractérisé par : i) une innervation de la CCI côté pilier, ii) une forte densité de récepteurs post-synaptiques, iii) un plus gros diamètre axonal et iv) beaucoup de mitochondries (Lieberman, 1982; Merchan-Perez and Liberman, 1996; Grant et al., 2010; Liberman et al., 2011). Ce gradient pilier/modiolus est maintenu jusqu'au ganglion spiral. Les corps cellulaires des neurones à basse et moyenne activité spontanée sont localisés du côté de la rampe vestibulaire alors que les neurones à haute activité spontanée sont uniformément distribués dans le ganglion spiral (Kawase and Liberman, 1992; Tsuji and Liberman, 1997).

Les projections centrales de ces différents groupes de neurones sont elles aussi différentes. Tous les neurones projettent sur les noyaux cochléaires, mais les neurones à basse activité spontanée ont un plus grand nombre de terminaisons nerveuses destinées à une innervation préférentielle de la région périphérique des petites cellules (Ryugo and Rouiller, 1988; Liberman, 1991). Nous verrons par la suite que les différences morphologiques des fibres à basse- et à haute- activité spontanée, s'accompagnent de différences fonctionnelles.

### *2.3.2.2. Enregistrements unitaires*

Les premiers enregistrements de l'activité unitaire d'un neurone cochléaire ont été réalisés par (Tasaki, 1954) chez le cochon d'inde et par (Katsuki et al., 1958) chez le chat. En général, chez les mammifères, les résultats obtenus sur une espèce peuvent être extrapolés à une autre espèce car les propriétés des réponses unitaires sont comparables. Il faut noter que la plupart, si ce n'est la totalité des enregistrements sont effectués sur des neurones provenant des cellules ciliées internes, car ils constituent près de 95% du nerf auditif (Spoendlin, 1969, 1972). L'amplitude des réponses enregistrées est de l'ordre du millivolt (mV).

La plupart des fibres présentent une activité spontanée dont le rythme de décharge peut aller jusqu'à plus d'une centaine de potentiels d'action (PA) par seconde. L'intervalle de temps séparant deux PA est aléatoire (Poisson), avec une

durée minimale d'environ une milliseconde, en raison de la période réfractaire des fibres. L'enregistrement des neurones auditifs primaires chez le chat (Lieberman, 1978) a montré qu'ils peuvent être classés en 3 groupes fonctionnels selon leur activité spontanée (AS).

On distingue ainsi les neurones à haute-AS ( $> 18$  PA/s), dont l'activité augmente dès les bas niveaux de stimulation, les neurones à basse-AS ( $< 0,5$  PA/s), dont l'activité n'augmente qu'à hauts niveaux de stimulation, et les neurones à moyenne-AS ( $0,5 \leq AS \leq 18$  PA/s), présentant des propriétés de codage intermédiaires. La distribution des neurones auditifs primaires selon cette classification est relativement homogène entre espèce (voir **Table 2.1**) avec une forte majorité de fibres à haute activité spontanée (60 - 75%) et une minorité de fibres à basse activité (10 - 16%). Il n'existe pas de données expérimentales chez l'homme. Comme précisé précédemment, ces différents groupes fonctionnels sont liés à l'hétérogénéité des synapses à ruban (**Figure 2.7**).

L'activité spontanée des fibres auditives primaires pourrait également être régulée par les fibres efférentes. En effet, l'application intra cochléaire de dopamine (neurotransmetteur du système efférent latéral) entraîne une réduction de l'activité spontanée des fibres du nerf auditif et une élévation du seuil de réponse à la stimulation sonore (Ruel et al., 2001; Le Prell et al., 2003). À l'inverse, l'application d'antagonistes de la dopamine provoque une augmentation de l'activité spontanée des neurones auditifs primaires et une amélioration de la sensibilité au seuil. Dans cette dernière expérience, l'augmentation de l'activité spontanée reflète probablement une levée d'inhibition tonique au niveau du site d'initiation du message auditif (Ruel et al., 2001).

**Tableau 2.1 : Distribution des fibres du nerf auditif chez différentes espèces.** Distribution des fibres suivant la classification basée sur l'activité spontanée. (haute : AS > 18 PA/s, moyenne : 0,5 ≤ AS ≤ 18 PA/s, basse : AS < 0,5 PA/s). Données acquises par la technique d'enregistrement unitaire.

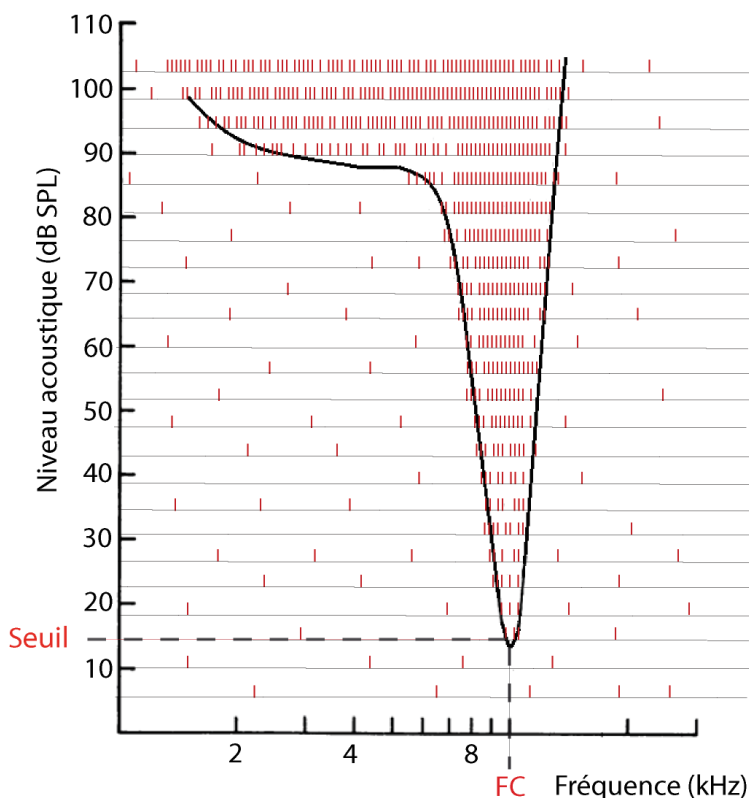
Animal	Fibres	Haute- AS	Moyenne- AS	Basse- AS	Référence
Chat	55000	61 %	23 %	16 %	(Liberman, 1978)
Cochon d'inde	24000	73 %	15 %	12 %	(Tsuji and Liberman, 1997)
Gerbille	18000	60 %	30 %	10 %	(Schmiedt, 1989)
Souris	9000	51 %	49 (AS < 20 PA/s)		(Taberner and Liberman, 2005)
Rat	14000	55%	45 (AS < 20 PA/s)		(Taberner and Liberman, 2005)

### 2.3.2.3. Réponses des fibres en fonction de la fréquence

En général, les fibres auditives répondent à une stimulation sonore par une modification (normalement une augmentation) de leur rythme de décharge au-dessus de leur activité spontanée. Chaque fibre du nerf auditif répond préférentiellement à une fréquence bien définie, appelée Fréquence Caractéristique (FC), qui dépend de la localisation de la CCI qu'elle innerve sur la membrane basilaire (carte tonotopique cochléaire). Aux plus bas niveaux de stimulation, la fibre ne répond qu'à cette fréquence de stimulation. Cependant, à mesure que le niveau de stimulation s'élève, la fibre répond à une plus grande gamme fréquentielle. On peut ainsi définir un domaine de réponse de la fibre, dans le plan fréquence-intensité, qui est délimité par une courbe de seuil représentant le niveau d'intensité nécessaire, à chaque fréquence, pour provoquer une augmentation du rythme de décharge de la fibre au-dessus de son activité spontanée (**Figure 2.9**).

À la fréquence caractéristique de la fibre, cette courbe de seuil, appelée "courbe d'accord" est basse et très pointue. Cette sélectivité en fréquence reflète celle du potentiel de récepteur de la CCI qu'elle innerve (Cf. **Figure 2.5**). Chaque fibre peut être considérée comme la sortie d'un filtre sélectif passe-bande, et l'ensemble du nerf cochléaire comme un faisceau issu d'un réseau de tels filtres. La grande sélectivité de ces filtres joue un rôle important dans l'analyse fréquentielle effectuée par la cochlée.

Pour les fibres de fréquence caractéristique supérieure à 2 kHz, les courbes d'accord sont asymétriques. Du côté des hautes fréquences, la pente quasi-verticale traduit l'absence de réponse pour des fréquences supérieures à la FC, même à des hauts niveaux d'intensité. Par contre, du côté des basses fréquences, la pente de la courbe d'accord est plus faible, jusqu'à présenter un plateau (queue d'activité) aux fortes intensités (**Figure 2.9**). Ainsi, une fibre basale, spécialisée à bas niveaux de stimulation dans le codage des hautes fréquences, peut également répondre aux basses fréquences de stimulation lorsqu'elles sont émises à forte intensité (propriétés liées aux caractéristiques physiques de la membrane basilaire). À hauts niveaux de stimulation, la perte de sélectivité fréquentielle des mécanismes cochléaires induit une forte augmentation du nombre de fibres recrutées par la stimulation et une



dégradation de l'analyse fréquentielle du message sonore.

**Figure 2.9:** Schéma représentant la forme d'une courbe d'accord (courbe de seuil) pour une fibre de fréquence caractéristique (FC) égale à 10 kHz. Cette figure schématise le domaine de réponse d'une fibre dans le plan fréquence-intensité. La courbe noire correspond à la courbe de seuil représentant le niveau d'intensité nécessaire, à chaque fréquence, pour provoquer une augmentation du rythme de décharge de la fibre au-dessus de son activité spontanée. Les tirets rouges représentent les potentiels d'action émis par la fibre. Plus ils sont rapprochés, plus le taux de décharge de la fibre est élevé. À mesure que le niveau de stimulation s'élève, la fibre répond à une plus large gamme de fréquences. (Schéma inspiré de Evans and Klinke, 1982))

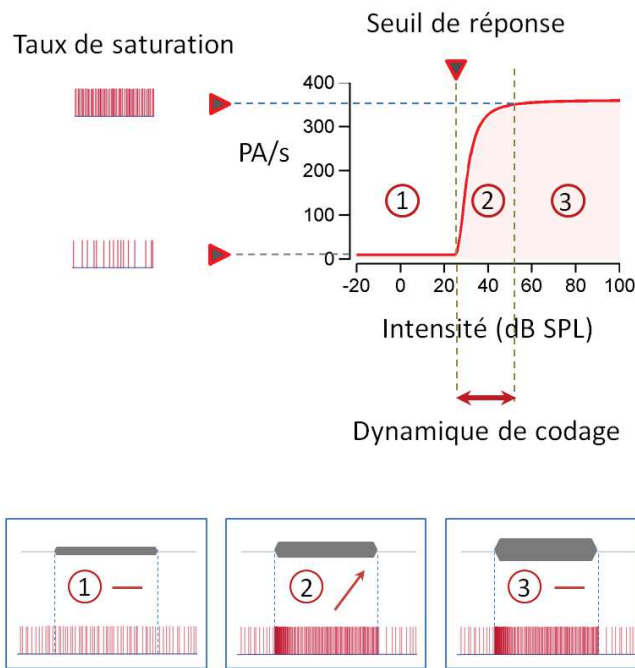
Pour les basses fréquences de stimulation, le codage fréquentiel est accentué par une synchronisation des décharges à chaque cycle de l'onde sonore. La réponse temporelle des fibres véhicule alors une information fréquentielle.

#### *2.3.2.4. Réponses des fibres en fonction de l'intensité*

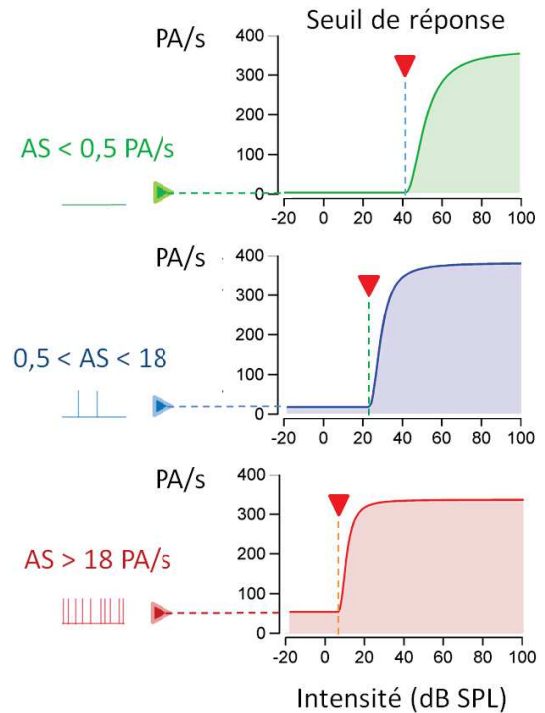
Le codage en intensité d'une fibre est généralement représenté par une courbe entrée-sortie mettant en évidence l'évolution du taux de décharge de la fibre avec l'augmentation du niveau de stimulation acoustique (**Figure 2.10A**). On distingue généralement 3 phases d'évolution : (1) Tant que le niveau de stimulation est inférieur au seuil de réponse de la fibre, celle-ci reste à son niveau d'activité spontanée. Autrement dit, la fibre ne répond pas à la stimulation et ce malgré l'augmentation du niveau de stimulation. (2) Lorsque le niveau de stimulation dépasse le seuil de réponse de la fibre, le taux de décharge de la fibre augmente avec le niveau de stimulation. La fibre participe alors au codage de l'intensité sonore. Mais rapidement, (3) le taux de décharge de la fibre atteint un niveau de saturation qui n'évolue plus avec le niveau de stimulation. Autrement dit, la dynamique de codage en intensité d'une fibre (20 à 40 dB) est très limitée par rapport à la dynamique en intensité du champ audible (environ 100 dB).

Pour assurer le codage de l'ensemble de la dynamique auditive, chaque cellule ciliée interne est innervée, selon l'espèce étudiée, par 10 à 30 fibres afférentes. Ainsi, outre l'augmentation du rythme de décharge des fibres, une augmentation d'intensité entraîne le recrutement de nouvelles fibres. À bas niveaux, la stimulation recrute progressivement les fibres présentant une fréquence caractéristique similaire à celle de l'onde sonore, en commençant par les fibres à bas seuils (fibres à haute-AS, **Figure 2. 10B**), puis les fibres à plus hauts seuils (moyenne- et basse-AS, **Figure 2.10B**). À hauts niveaux de stimulation, la perte de sélectivité fréquentielle induit le recrutement d'un grand nombre de fibres innervant la base de la cochlée.

## A. Etude du codage en intensité



## B. Classification fonctionnelle



**Figure 2.10 : Codage en intensité des fibres auditives.** **A.** Etude du codage en intensité d'une fibre auditive. L'évolution du taux de décharge d'une fibre auditive en fonction de l'intensité acoustique de stimulation est généralement représentée par une fonction sigmoïde. Tant que le niveau de stimulation acoustique est inférieur au seuil de réponse de la fibre (1), celle-ci reste à son niveau d'activité spontanée. Lorsque le niveau de stimulation dépasse le seuil de réponse de la fibre (2), le taux de décharge de la fibre augmente avec le niveau de stimulation. Mais rapidement, le taux de décharge de la fibre atteint un niveau de saturation (3) qui n'évolue plus avec le niveau de stimulation. **B.** Les fibres à haute activité spontanée ( $AS > 18$  PA/s, rouge) codent les bas niveaux de stimulation, les fibres à basse activité spontanée ( $AS < 0,5$  PA/s, vert) codent les plus hauts niveaux de stimulation, et les fibres à moyenne activité spontanée ( $0,5 < AS < 18$  PA/s, bleu) codent les niveaux intermédiaires (Liberman, 1978).

### 2.3.2.5. Réponses des fibres en fonction du temps

Pour les basses fréquences de stimulation, le potentiel de récepteur des CCI conserve une composante alternative (microphonique) reproduisant la fréquence du stimulus. Cette composante alternative dépolarise la CCI durant les phases acoustiques de raréfaction et l'hyperpolarise durant les phases de condensation. Il en résulte une libération accrue du neurotransmetteur, donc une accélération des décharges durant la phase de raréfaction, et une rétention du neurotransmetteur, donc une diminution de l'activité spontanée de la fibre, lors de la phase de



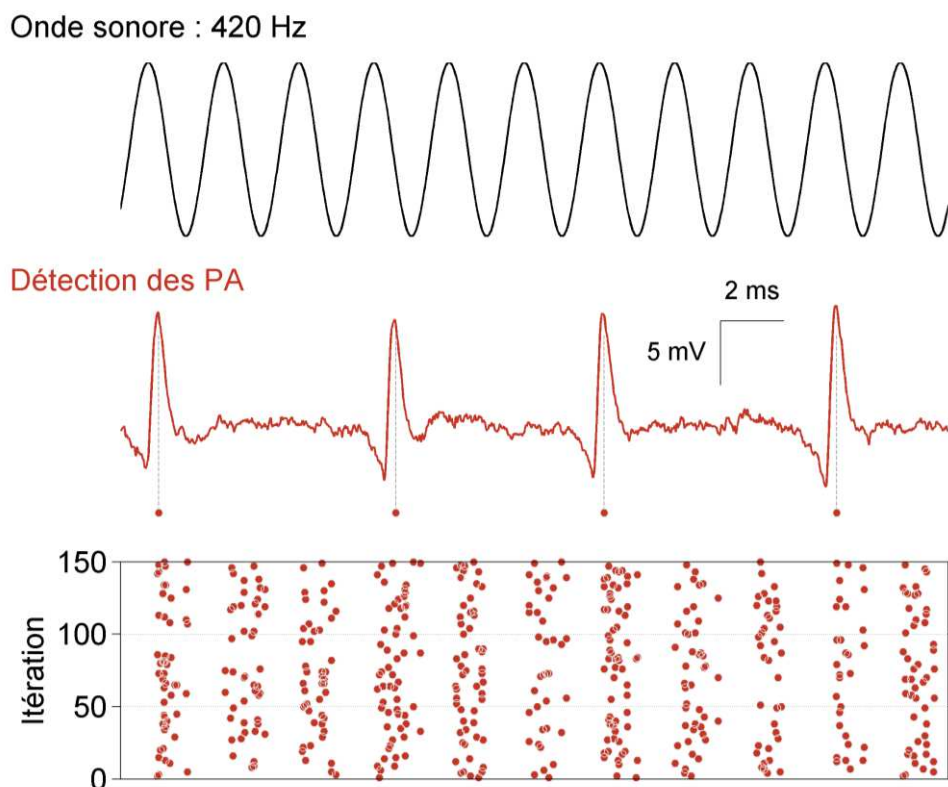
condensation. Ainsi, les potentiels d'action générés par la fibre se concentrent autour des phases de raréfaction de l'onde sonore (phénomène de verrouillage de phase).

Pour les basses fréquences de stimulation, les potentiels d'action peuvent être émis à chaque cycle de l'onde sonore, ou de façon plus espacée mais toujours dans la même phase de l'onde sonore (**Figure 2.11**). Les intervalles de temps séparant les potentiels d'action correspondent alors approximativement aux multiples entiers de la période du stimulus acoustique. C'est en sommant les décharges émises par les différentes fibres répondant à la stimulation que le système nerveux détecte une fréquence de décharge identique à celle de la stimulation sonore (Rose et al., 1967).

Pour les hautes fréquences de stimulation ( $> 2$  kHz), la composante alternative (microphonique) du potentiel de récepteur des CCI est filtrée par les propriétés électriques de la membrane cellulaire (**Figure 2.5B**). Elle fait place à une composante continue qui dépolarise la cellule pendant toute la durée de la stimulation. Après une forte synchronisation du premier potentiel d'action évoqué par la stimulation (**Figure 2.12B**), le taux de décharge de la fibre diminue puis devient globalement constant pendant toute la durée de la stimulation. La forte synchronisation du premier potentiel d'action évoqué en début de stimulation reflète la libération rapide du contingent de vésicules arrimées à la membrane plasmique (Readily Releasable Pool - Moser and Beutner, 2000). Le passage à une activité plus aléatoire mais globalement soutenue reflète la libération continue de vésicules plus éloignées des zones actives (Slowly Releasable Pool). L'étude du codage temporel des fibres auditives peut ainsi nous donner des indications sur les mécanismes de libération du neurotransmetteur par la CCI. On parle d'adaptation pour désigner la diminution du taux de décharge de la fibre observée après la réponse synchrone des premiers potentiels d'action évoqués.

La réponse temporelle d'une fibre peut s'étudier sous la forme d'un histogramme temporel représentant l'évolution du taux de décharge d'une fibre en fonction du temps. Cet histogramme (*PSTH : Peri-Stimulus Time Histogram*) est construit à partir par des trains de PA générés par une fibre lors d'une stimulation itérative. Avant le début de la stimulation, ce PSTH représente l'activité basale (AB) de la fibre (**Figure 2.12**). Pour des stimulations rapprochées dans le temps, cette activité basale aura tendance à être inférieure à l'activité spontanée de la fibre. En réponse à une haute fréquence

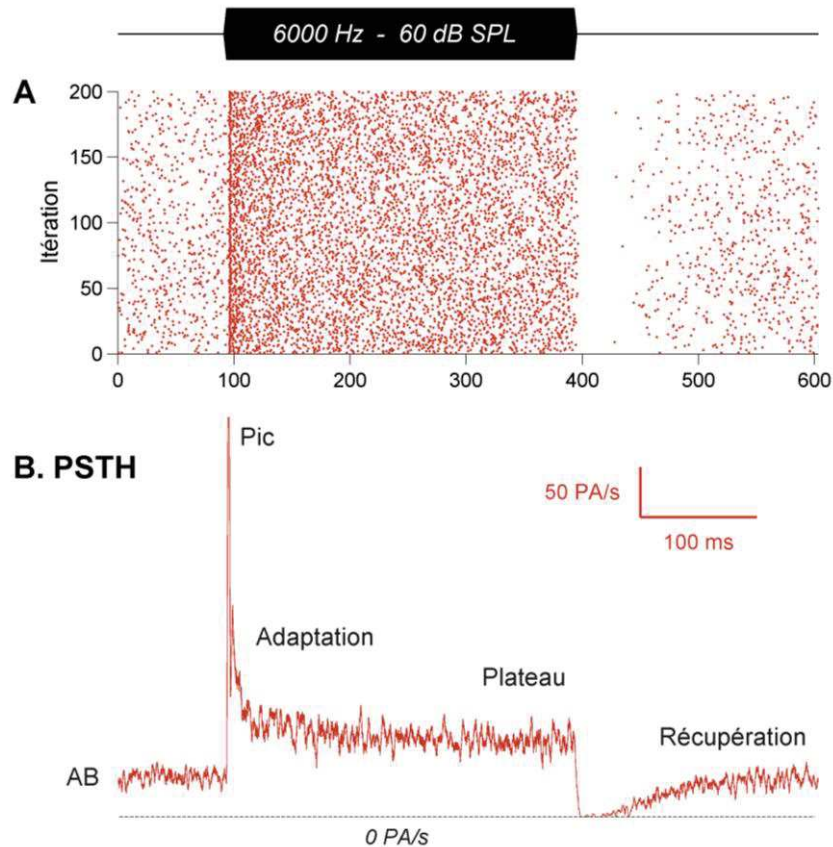
de stimulation, le PSTH d'une fibre auditive met en évidence : une rapide augmentation du taux de décharge en début de stimulation (*Pic*), suivie d'une rapide diminution d'activité (*Adaptation*), puis un taux de décharge maintenu constant pendant toute la durée de la stimulation (*Plateau*). À la fin de la stimulation, on observe une inhibition d'activité, avec un taux de décharge qui peut rester nul pendant plusieurs millisecondes. Par la suite la fibre retrouve progressivement son niveau d'activité basale (*Récupération*).



**Figure 2.11 : Verrouillage de phase pour les basses fréquences de stimulation.** Cet exemple présente l'activité unitaire d'une fibre enregistrée pendant la présentation d'une bouffée tonale de 420 Hz, émise à 60 dB SPL. Les points rouges représentent les instants de détection des potentiels d'action (PA) émis par la fibre lors des 150 itérations de la stimulation (enregistrements réalisés dans l'équipe chez une gerbille).

Lorsque l'intervalle de temps compris entre deux stimulations est suffisamment long pour permettre à la fibre de récupérer son activité spontanée, l'activité basale du PSTH est égale à l'activité spontanée de la fibre. Notons que le temps de récupération des fibres à basse activité spontanée est beaucoup plus long que celui des fibres à haute activité spontanée. Chez le chinchilla, pour un son pur présenté à 80 dB SPL pendant 100 ms, l'étude de (Relkin and Doucet, 1991) estime le temps de

recupération des fibres à basse-AS à 2 secondes, contre 200 millisecondes pour les fibres à haute-AS. Cette observation pourrait en partie expliquer pourquoi le pic des PSTH est plus petit pour les fibres à basse-AS que pour les fibres à haute-AS (Rhode and Smith, 1985; Müller and Robertson, 1991).



**Figure 2.12 : Histogramme temporel de décharge d'une fibre.** **A** : Les points rouges représentent les instants de détection des potentiels d'action émis par la fibre lors des 200 premières itérations de la stimulation (montée=descente=2,5 ms, durée=300 ms, intervalle-inter stimulation=300 ms, 500 présentations). Les potentiels d'action détectés avant le début de chaque stimulation mettent en évidence le niveau d'activité basale de la fibre, proche de son niveau d'activité spontanée (AS=42 PA/s). **B** : L'histogramme temporel de décharge de la fibre (PSTH : Peri-Stimulus Time Histogram) est construit à partir des PA détectés au cours des 500 présentations de la stimulation, avec un pas temporel égal à 2 ms. Avant le début de la stimulation, ce PSTH met en évidence le niveau d'activité basale (AB) de la fibre. La ligne pointillée horizontale représente le taux de décharge égal à 0 PA/s (enregistrements réalisés dans l'équipe chez une gerbille).

### Codage de l'enveloppe temporelle :

D'un point de vue acoustique, un signal de parole est composé de motifs spectro-temporels complexes. Paradoxalement, malgré cette richesse temporelle et spectrale, des expériences psychoacoustiques ont démontré que la reconnaissance de la parole dans le silence repose principalement sur les indices temporels avec un

rôle prépondérant de l'enveloppe (Shannon et al., 1995 ; Smith et al., 2002). Dans cette étude, les auteurs ont utilisé des vocodeurs pour dégrader le contenu spectral d'un signal de parole tout en préservant l'enveloppe. Les performances de reconnaissance de paroles sur signaux vocodés en utilisant seulement 4 bandes de bruits étaient remarquablement élevées démontrant ainsi le rôle prépondérant de l'enveloppe temporelle. Les performances des sujets implantés cochléaires en sont également la preuve puisque quelques canaux fréquentiels de stimulation suffisent à restituer la compréhension de la parole chez des sujets sourds.

Les fluctuations d'enveloppe de la parole se produisent généralement à des fréquences comprises entre 2 Hz et 50 Hz (Rosen, 1992). De nombreuses études ont été menées dans le but d'identifier les mécanismes physiologiques de codage et de décodage de l'enveloppe temporelle (Joris et al., 2004). Une approche expérimentale simple consiste à présenter un son haute fréquence modulé en amplitude par une enveloppe basse fréquence puis de calculer l'indice de synchronisation entre l'enveloppe et la réponse nerveuse (Dreyer and Delgutte, 2006). Des études basées sur des enregistrements unitaires de fibres du nerf auditif ont montré qu'une population de fibres (les fibres à basse activité spontanée (<0,5 spike/s) caractérisées par un haut seuil d'activation) était particulièrement apte à coder l'enveloppe (Joris and Yin, 1992; Cooper et al., 1993). Comparé à la population des fibres à haute activité spontanée (>18 spikes/s) qui contribue au codage du seuil auditif, le taux de décharge des fibres à basse activité spontanée suit l'enveloppe sur une plus grande dynamique sonore. Par ailleurs, il a été démontré que cette population de fibres était également la plus sensible au traumatisme sonore (Furman et al., 2013). Transposés à l'homme, ces résultats suggèrent qu'un traumatisme sonore modéré pourrait n'avoir aucun effet sur l'audiogramme mais des conséquences importantes sur le codage de l'enveloppe et donc sur la reconnaissance de la parole.

La dégradation des seuils audiométriques influence la capacité de discrimination fine de changements fréquentiels, et la détection de modulations d'amplitude (ou d'intensité), paramètre important pour l'intelligibilité (Nelson et al., 1983; Freyman and Nelson, 1991; Florentine et al., 1993). Indépendamment de la dégradation des seuils, l'âge impacte aussi la capacité de discrimination fréquentielle et de discrimination d'intensité (He et al., 1998).

Cependant, même quand leurs seuils auditifs sont normaux ou sub-normaux ou quand leur audibilité correspond à celles des jeunes adultes, les sujets âgés peuvent présenter une résolution temporelle dégradée (Dubno et al., 1984 ; Gordon-Salant and Fitzgibbons, 1993; Snell and Frisina, 2000; Walton, 2010; Ruggles et al., 2012). En l'absence de preuves de dégradation comme l'élévation des seuils auditifs prouvant une implication périphérique, les facteurs centraux et cognitifs sont souvent invoqués pour expliquer la baisse des performances temporelles du sujet âgé (Frisina and Frisina, 1997; Krull et al., 2013).

Récemment, suite à une étude sur le codage de l'enveloppe temporelle, il a été avancé que la ségrégation des sons en milieu bruyant (isoler une parole parmi d'autres paroles) pourrait provenir d'un traitement primaire périphérique cochléaire (Parthasarathy et al., 2016).

Le codage de l'enveloppe temporelle peut être étudié électrophysiologiquement en mesurant l'activité synchronisée des oscillations à l'aide des auditory steady-state response (ASSR) (pour une revue sur les ASSR, voir Picton, 2010). Tlumak et al. (2015) ont mesuré les ASSR à une fréquence de modulation (FM) lente (5 Hz) chez des sujets jeunes, d'âges mûrs et âgés. Les ASSR étaient plus amples chez les sujets âgés comparés aux sujets jeunes. Les auteurs en déduisent qu'au cours du vieillissement la synchronisation des ondes theta est augmentée. Goossens et al. (2016) confirme ce résultat et ajoute qu'au cours du vieillissement les ASSR sont moins amples pour les FM supérieures à 70 Hz chez les sujets âgés que chez les jeunes.

La perte d'intelligibilité en présence de bruit de fond exprimée par les presbyacousiques est liée en partie à la dégradation liée à l'âge du traitement temporel (Welford, 1984; Gordon-Salant and Fitzgibbons, 1993; Schneider et al., 1994 ; Fitzgibbons and Gordon-Salant, 1995; Turner et al., 1995; Snell, 1997; Fitzgibbons et al., 2006; Gifford et al., 2007; Pichora-Fuller et al., 2007). L'enveloppe des sons sinusoïdalement modulés en amplitude est codée à tous les niveaux du système auditif (Joris et al., 2004 ; Ter-Mikaelian et al., 2007), où plusieurs auteurs pensent que les circuits inhibiteurs améliorent le codage temporel (Koch and Grothe, 1998; Backoff et al., 1999 ; Krishna and Semple, 2000; Caspary et al., 2002; Ter-Mikaelian et al., 2007). Les humains présentent des déficits liés à l'âge dans la discrimination de profondeur

des modulations d'amplitude (Takahashi and Bacon, 1992; Leigh-Paffenroth and Fowler, 2006) et de nombreuses autres tâches de discrimination temporellement exigeante telles que la discrimination de la parole et la localisation sonore dans l'espace (Warren et al., 1978 ; Brown, 1984; Barsz et al., 2002). La détection d'un bref silence (« gap detection ») est également perturbée. Le plus petit silence détecté dans une enveloppe temporelle, en présence, ou en absence de bruit de fond (Snell, 1997) est plus grand chez les sujets âgés, ce qui suggère une capacité moindre de suivi temporel des stimuli sonores.

Chez les rongeurs, les changements neuraux dans le traitement des signaux de modulation d'amplitude ont été trouvés dans le Colliculus inférieur (Palombi and Caspary, 1996; Walton et al., 2002 ; Simon et al., 2004). Des études fonctionnelles et neurochimiques chez l'animal suggèrent que le vieillissement sensoriel doit commencer par une lente et progressive déafférentation périphérique qui peut déclencher une régulation top-down compensatrice activité-dépendante de neurotransmission inhibitrice centrale (Caspary et al., 1990, 2002, 2005 ; Schmolesky et al., 2000; Mendelson and Ricketts, 2001; Leventhal et al., 2003; Yu et al., 2006). Ainsi, les déficits de traitement sensoriel central liés à l'âge observés en clinique peuvent probablement être attribués au moins en partie aux décrets (réductions) de la neurotransmission inhibitrice (Betts et al., 2007).

### 2.3.3. Potentiels électriques globaux

Les réponses décrites jusqu'à présent sont les réponses unitaires obtenues chez l'animal grâce à une microélectrode placée de façon invasive au contact d'une fibre auditive. Chez l'homme, seuls les potentiels électriques globaux peuvent être enregistrés pour étudier l'activité des fibres auditives. L'observation de ces réponses globales est plus facile (approche peu invasive) et permet de réaliser une évaluation tonotopique de l'ensemble des fibres auditives.



### *2.3.3.1. Potentiel d'action composite du nerf auditif*

Le potentiel d'action composite du nerf auditif peut être enregistré chez l'homme au moyen d'une électrode placée dans le conduit auditif externe, ou mieux (avec un gain de 10) par une électrode transtympanique s'appuyant sur le promontoire de la cochlée (Aran et al., 1969). Ce potentiel d'action composite (PAC) représente la sommation des activités unitaires d'un grand nombre de fibres en début de stimulation. Il est donc d'autant plus ample que les réponses unitaires sont nombreuses et bien synchronisées.

En réponse à un clic large bande, l'activité des fibres provenant de la base (région des hautes fréquences) est plus synchronisée que celle des fibres provenant de l'apex. Ainsi, la contribution des fibres basales dans l'élaboration du PAC est prépondérante. Cependant, en utilisant des stimulations plus spécifiques en fréquence, telles que des bouffées tonales, on peut interroger sélectivement différentes fréquences. D'une manière générale, on peut dire que la forme du PAC résulte du produit complexe, dans le temps (convolution) de deux fonctions (Goldstein and Kiang, 1958) : d'une part, celle qui décrit la forme d'un potentiel d'action unitaire telle qu'il apparaît au niveau de l'électrode d'enregistrement (par exemple, la fenêtre ronde chez l'animal, le promontoire chez l'homme) et d'autre part, celle qui décrit, statistiquement, le nombre de ces potentiels d'action unitaires apparaissant à chaque instant après la stimulation sonore (histogramme temporel de décharge).

L'enregistrement de l'activité cochléaire (électrocochléographie) permet d'étudier les réponses des cellules ciliées et des neurones cochléaires indépendamment des processus auditifs centraux. Comme pour tous les potentiels électriques globaux, il est important de prendre certaines précautions pour isoler la réponse neurale (absence de coexistence d'un artefact de stimulation et/ou d'une réponse sensorielle (Starr et al., 1991)). Cependant, ce traitement de signal est plus facile à réaliser à partir des réponses cochléaires, plus amples et plus sensibles à l'activité des neurones cochléaires, que les potentiels de surface. Notons également que le risque de transfert crânien (réponse de l'oreille controlatérale) est négligeable par rapport à celui rencontré avec l'enregistrement des potentiels de surface.



Ainsi, bien que le PAC forme la composante principale du complexe de l'onde I des potentiels évoqués auditifs précoces, il reste plus facile à analyser que cette dernière. L'amplitude du PAC, mesurée entre ses deux premières ondes  $N_1$  et  $P_1$ , est de l'ordre de quelques dizaines de microvolts. Moins d'une centaine de répétitions sont nécessaires pour éliminer par moyennage le bruit de fond parasite.

### *2.3.3.2. Potentiels évoqués auditifs précoces (PEAP)*

Ces potentiels de surface (électrode placée au niveau du crâne) permettent d'enregistrer 5 ondes majeures. La première, avec une latence d'environ 1 ms, reflète le potentiel du nerf auditif ; les autres, celles des noyaux relais du tronc cérébral. Si la technique d'enregistrement de l'onde I des PEAP est moins invasive que celle du PAC, le potentiel du nerf auditif ainsi obtenu est plus délicat à analyser. En effet, les PEAP sont de faible amplitude ( $< \mu\text{V}$ ) et nécessitent un moyennage important (1000 à 2000 répétitions) pour être extraits du bruit de fond.

Généralement évoqués par une succession de clics (jusqu'à 50 clics par seconde), la réponse globale recueillie provient essentiellement de la base de la cochlée. L'apparition de l'onde V permet d'estimer un seuil auditif, attribué aux fréquences comprises entre 2000 et 4000 Hz, et l'étude des latences et des amplitudes des 5 ondes permet de détecter des lésions sur les voies auditives. Dans les atteintes centrales, l'indication essentielle est obtenue par l'augmentation du temps de conduction centrale mesuré par l'écart entre l'onde I (ou  $N_1$  du PAC) et l'onde V du tronc cérébral (Portmann et al., 1980).

Les PEAP sont au cœur de la définition opérationnelle des neuropathies auditives dont le dépistage repose sur la démonstration d'une abolition ou d'une altération majeure des PEAP incluant l'onde I, avec la préservation de la réponse des cellules ciliées externes (Starr et al., 1996).

### 2.3.3.3. Potentiels stationnaires (ASSR)

Les ASSR diffèrent significativement de l'ensemble des potentiels électriques globaux, dits transitoires, discutés jusqu'à présent parce qu'ils sont évoqués par des stimuli de longue durée. Ces stimuli consistent en une fréquence porteuse (la fréquence audiométrique à tester) modulée en amplitude et/ou en fréquence à des rythmes de quelques dizaines à une centaine de Hz. Les ASSR reflètent la décharge synchrone des neurones auditifs accordés sur la fréquence porteuse, mais en synchronisant leur décharge sur la fréquence de modulation (Kuwada et al., 1986). Ils proviennent du cortex auditif et de l'étage mésencéphalique du tronc cérébral.

Reposant sur des stimuli de longue durée, ils possèdent une spécificité fréquentielle compétitive par rapport aux bouffées tonales (Cone-Wesson et al., 2002) et bien évidemment incomparablement meilleure que le clic. Les potentiels stationnaires ne peuvent être utilisés pour évaluer les seuils comportementaux mais ils contribuent à enrichir le tableau électrophysiologique des potentiels globaux.

## 2.4. La presbyacousie

Historiquement, c'est Roosa (Roosa D.B. 1885) qui le premier proposa le terme de « Presbyacousis » pour définir la surdité liée à l'âge. Cette terminologie s'est d'abord limitée aux seuls effets de l'âge sur la fonction auditive (Eisdorfer and Wilkie, 1972; Rahko et al., 1985 ; Pedersen et al., 1989; Hinchcliffe, 1990; Gates and Cooper, 1991). Puis, la notion de presbyacousie a évolué pour englober les effets cumulés et de l'âge. On admet aujourd'hui que la presbyacousie, est sous la dépendance de facteurs génétiques (polygéniques) et de facteurs environnementaux (Hawkins, 1973; Willott et al., 2001). La complexité de cette pathologie est liée à la superposition des effets du vieillissement général de l'individu et de gène de susceptibilité ou de résistance de la cochlée au bruit et/ou aux drogues ototoxiques.



américains et danois. Plus de 70% des personnes âgées de 65 ans et plus présenterait des problèmes auditifs (Galas et al., 2012). D'un point de vue fonctionnel, la presbyacousie peut se décomposer en trois stades : un stade précoce, sans traduction clinique où la baisse des sons aigus passe inaperçu. Un stade débutant vers la soixantaine où le handicap se manifeste parce que la perte auditive a atteint le seuil de gêne de 30db pour une fréquence de 2000 Hz et se double d'une difficulté de compréhension de la parole dans un environnement bruyant. Enfin, un stade d'isolement relationnel dû à l'aggravation de la surdité per se et de la discrimination des sons y compris dans un environnement calme.

#### *2.4.1.1. Facteurs environnementaux*

Les facteurs actuellement connus comme favorisant la presbyacousie sont l'exposition au bruit, le tabagisme, la prise de certains médicaments, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, et les facteurs génétiques (Cruickshanks et al., 1998). Une étude, publiée en 1962, a révélé que dans une tribu du Soudan, qui vit dans un environnement très silencieux, et dont le régime alimentaire végétarien est frugal, il n'existe pas de presbyacousie (Rosen et al., 1962). Cependant, l'âge des patients était difficilement vérifiable, et il est difficile de tirer des conclusions rigoureuses. Une autre étude plus documentée a été réalisée en 1986 sur l'île de Pâques (Goycoolea et al., 1986). Cette dernière consistait à comparer l'audition des personnes âgées d'environ 60 ans dans trois groupes de population. Dans l'un des groupes, les personnes n'avaient pas quitté l'île. Dans le second groupe, les personnes avaient quitté l'île et avaient travaillé sur le continent dans des conditions ordinaires pendant trois à cinq ans. Enfin le troisième groupe était constitué de personnes qui avaient vécu sur le continent plus de cinq ans. L'élévation du seuil de perception auditive constatée chez les personnes ayant vécu sur le continent, a été attribuée à l'exposition excessive au bruit. Cette étude illustre le rôle des facteurs environnementaux, en particulier de l'exposition au bruit, dans la presbyacousie. Pourtant, on estime actuellement que les gènes contribuent à environ 50 % du phénotype presbyacousie (Ciorba et al., 2015).

#### **-Les facteurs de risque médicaux-**

De nombreux auteurs ont mis en évidence une relation entre la surdité et l'artériosclérose, en étudiant les facteurs de risques cardio-vasculaires - hypertension

artérielle, hypercholestérolémie, hypertriglycéridémie (Rosenhall et al., 1990; Dalton et al., 1998). Les anomalies métaboliques comme le diabète non insulino dépendant (Gates et al., 1999) peuvent aussi avoir un effet délétère sur l'oreille interne. Le tabagisme a été aussi décrit comme facteur de risque de la presbyacousie, les fumeurs ont 1,69 de fois plus de chances de présenter une surdité de perception que les non-fumeurs (Cruickshanks et al., 1998). Les relations avec le fonctionnement cognitif ou les démences ont encore été peu étudiés. Toujours dans l'étude de Framingham, les troubles auditifs précèderaient l'apparition d'une démence.

### **-Les médicaments ototoxiques -**

Certaines lésions de l'oreille interne (cochlée ou du vestibule) sont liées à la prise de certains médicaments ototoxiques. Cette ototoxicité serait exacerbée par le vieillissement en raison de modifications pharmacocinétiques. Aux Etats-Unis, on estime que la surdité médicamenteuse touche entre 2 et 3 patients sur 1000 traités par un médicament ototoxique ((Wang and Puel, 2008). Plus de 130 médicaments ont été reconnus potentiellement ototoxiques, parmi lesquels certains antibiotiques (Streptomycine, Viomycine, Sisomycine, etc), des anti-inflammatoires (Dupéran, Indicid), des diurétiques (Lasilix), les oestrogènes et la vitamine A (facteur aggravant de l'otospongiose) ou encore la quinine qui provoquent des acouphènes, des hypoacousies ou des vertiges. Le cisplatine, agent chimiothérapique utilisé dans le traitement de certains cancers (comme par exemple les cancers du poumon à petites cellules), détruit les cellules ciliées et entraîne une surdité irréversible (Benkafadar et al., 2017). Les personnes âgées, dont l'audition est déjà altérée, présentent des risques plus importants d'avoir une élévation de leurs seuils auditifs après une chimiothérapie. Les médicaments ototoxiques peuvent donc interagir avec la presbyacousie en majorant la surdité liée au seul vieillissement.

### **-Le bruit -**

L'exposition au bruit intense quel que soit l'âge est source de perte temporaire ou permanente de l'audition. Plusieurs études épidémiologiques (Mills et al., 1997; Dalton et al., 2001; Nondahl et al., 2000) ont montré une association de la perte d'audition avec l'exposition aux bruits professionnels (la surdité est au premier rang des maladies professionnelles) et de loisir (musique amplifiée, chasse ...). Les études de modèles

animaux suggèrent que l'âge auquel se produit l'exposition au bruit et/ou une presbyacousie préexistante contribue à la sévérité des dommages cochléaires induits par le bruit, sauf si le bruit est très intense. Des études chez la souris C57 montrent que le gène *Ah1* est responsable du phénotype presbyacousie, indépendamment de toute exposition au bruit et que ce même gène augmente par ailleurs la vulnérabilité cochléaire au bruit (Erway et al., 1996, Davis et al., 2001).

#### *2.4.1.2. Facteurs génétiques*

Plusieurs arguments sont en faveur d'une composante génétique de la presbyacousie. Une étude de jumeaux âgés Christensen et al. (2001) a montré une prévalence plus élevée de la presbyacousie chez les jumeaux monozygotes que chez les dizygotes et permis l'évaluation de l'héritabilité du phénotype presbyacousie à 0,4 (proportion de la variance due à des gènes). Dans ces travaux, la surdité est évaluée par entretien. L'héritabilité estimée sur la cohorte de Framingham, où l'évaluation de la perte auditive est basée sur des tests audiométriques, est comprise entre 0,35 et 0,55 (Gates et al., 1999). Cette même étude montre une agrégation familiale des niveaux d'audition et du phénotype presbyacousie. Une étude génétique d'une forme familiale précoce rare de presbyacousie montre une liaison au locus DFNA25 sur le chromosome 12 (Greene et al., 2001; Ruel et al., 2008).

La première recherche de loci de susceptibilité par analyse systématique du génome total (De Stephano et al., 2003) a été effectuée sur des familles issues de la cohorte de Framingham présentant une presbyacousie. L'analyse de liaison effectuée sur un phénotype quantitatif de l'audition révèle que 6 régions chromosomiques présentent des valeurs suggestives de liaison elles sont localisées sur les chromosomes 10, 14, 18 et 3 régions sur le chromosome 11. Plusieurs de ces régions contiennent des gènes connus responsables de surdités mendéliennes congénitales. En 11.35 est localisé le gène de la myosine 7A (*Myo7a*) dont les mutations sont responsables de plusieurs phénotypes différents tels que le syndrome de Usher type 1B (Weil et al., 1995) et une surdité récessive non syndromique (DFNA2) (Liu et al., 1997; Weil et al., 1997). La deuxième région sur le chromosome 11p contient le gène de l'harmonine (Verpy et al., 2000), protéine du cytosquelette des cellules ciliées dont les

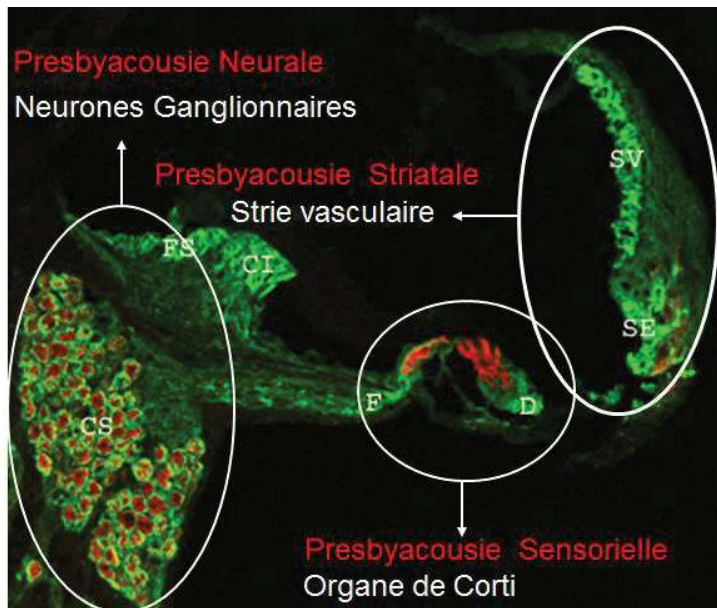
mutations sont responsables du syndrome de Usher 1C. Enfin dans la troisième région 11q25, se trouve le locus DFNB20 (Moynihan et al., 1999) responsable d'une surdité dont le gène n'est pas encore identifié. La région du chromosome 14q contient le gène responsable du syndrome de Usher de type 1A (Kaplan et al., 1992). Aucun gène connu de surdité n'a été décrit dans les régions chromosomiques 10q26 et 18q suggérées par cette analyse de génome. En particulier, la région 10q26 n'est pas la région orthologue humaine (10q21-22) du chromosome murin (10) sur lequel a été localisé le premier gène majeur de susceptibilité Ah1 (Erway et al., 1993 ; Johnson et al., 1997). Par la suite, Friedman et al. (2009) montre une relation entre la presbyacousie et la mutation d'une seule paire de bases sur le gène GRM7, codant pour un récepteur du glutamate mGluR7. Ce récepteur est exprimé dans les cellules ciliées et les neurones auditifs du ganglion spiral. Ce faisant, cette mutation pourrait être à l'origine d'une excitotoxicité liée à une accumulation de glutamate dans la fente synaptique entre les CCI et les CCEs. Enfin, Ruel et al. (2008) montre l'implication du gène SLC17A8 dans la presbyacousie précoce DFNA25, ce dernier étant impliqué dans le remplissage des vésicules synaptiques. Plus récemment, montre l'invalidation de la pejkavine chez la souris ou la mutation de ce gène chez l'homme entraîne une hypersensibilité au traumatisme sonore (Delmaghani et al., 2015).

#### 2.4.2. Données expérimentales

Les modèles animaux soulignent aussi l'importance des facteurs génétiques dans le vieillissement de l'audition et leurs interactions avec les facteurs environnementaux. Ici, nous nous bornerons à illustrer, à travers quelques exemples, comment les modèles de souris peuvent contribuer à la compréhension de la presbyacousie chez l'Homme. Henry (1982), et plus tard Li and Borg (1991) ont évalué la susceptibilité au bruit de différentes souches de souris (Erway et al., 1996 ; Eisdorfer and Wilkie, 1972). Il a fallu attendre 1996 pour que Erway et ses collaborateurs montrent que la susceptibilité au bruit de la souche murine C57BL/6 obéissait à une transmission autosomale récessive, et postulent pour l'existence d'un locus ahl (age-related hearing loss, Friedman et al., 2000). Dans une autre étude sur la souche C57BL/6, les mêmes auteurs relient le locus ahl au vieillissement cochléaire (Zettel et al., 2001). D'autres équipes localisent le locus sur le chromosome 10 (Gates, 1986), ce qui leur permet d'envisager un lien étroit entre la susceptibilité au bruit et le vieillissement cochléaire. A ce jour, trois nouveaux loci



ont été associés à la vulnérabilité au bruit, et cinq autres sont impliqués à la fois dans la vulnérabilité au bruit et dans le vieillissement cochléaire (voir **Tableau 2.2**).



**Figure 2.14 : Physiopathologie de la presbycousie.** La presbycousie est dite “sensorielle” si elle est due à la perte de cellules sensorielles, “striatale” si elle est due à une altération de la strie vasculaire, et “neuronale” si elle est due à une perte de neurones. Image : Jing WANG, Inserm 1051.

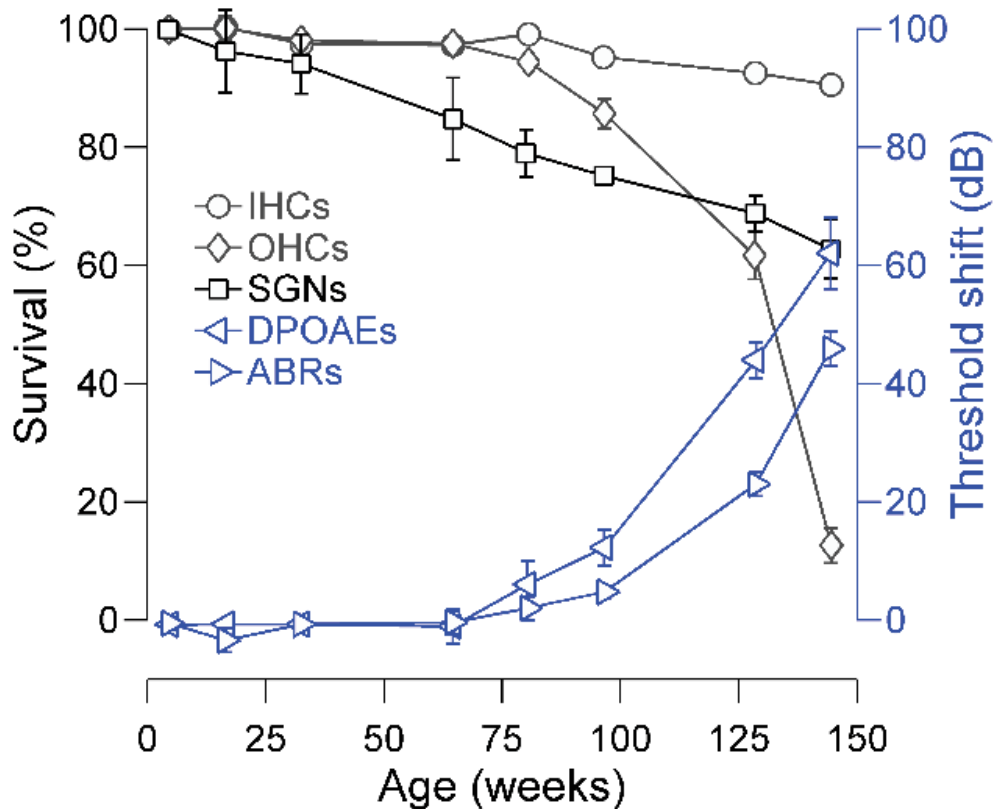
#### 2.4.2.1. Presbycousie sensorielle

On sait depuis longtemps que certaines lignées de souris sont atteintes de surdités précoces (Gates et al., 1990). L'implication d'une protéine constitutive des stéréocils des cellules sensorielles auditives a été mise en évidence à partir de la lignée B6/CAST-Cdh23CAST, porteuse d'une mutation de la cadhérine 23. Dès l'âge d'un an, ces souris présentent une dégénérescence de l'organe de Corti suivant un gradient base-apex. D'autres lignées comme BALB/c, CBA/J, 129S6/SvEv montrent des altérations des cellules de soutien (noyau fragmenté, cytoplasme dense...), alors que les cellules sensorielles sont intactes (Gates and Cooper, 1991). L'endommagement de ces cellules de soutien contribue aux pertes auditives liées à l'âge, de manière directe, en affectant la micromécanique de la cochlée ou indirectement, en favorisant la perte des cellules sensorielles.

#### 2.4.2.2. Presbycousie neuronale

Un modèle murin intéressant est le knock out AChR $\beta$ 2. Pour le décrire, rappelons-nous que les terminaisons des neurones ganglionnaires sont contactées par les axones efférents dont les corps se situent dans l'olive supérieure latérale. Ces efférences latérales contiennent des neurotransmetteurs "classiques" (acétylcholine, dopamine, GABA) et des neuropeptides (enképhalines, dynorphines, CGRP) connus

pour leur contrôle de l'activité des neurones ganglionnaires et qui pourraient jouer un rôle neurotrophique important dans le maintien en vie de ces neurones. L'invalidation de la sous-unité  $\beta 2$  des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine, présents sur les terminaisons des neurones ganglionnaires, entraîne une surdité et une diminution drastique du nombre de ces neurones. D'autre part, ainsi qu'on a pu le constater chez l'Homme âgé (Cooper and Gates, 1991), des phénomènes de regroupement de neurones survivants, par trois ou quatre dans la même gaine de myéline, ont été observés chez des souris présentant une dégénérescence neurale, telles que les souris C57BL/6 précédemment citées. Si le mécanisme à l'origine de ce phénomène est inconnu, le partage d'une même cellule de Schwann pourrait promouvoir la survie des neurones en leur offrant une même cible synaptique. Récemment, Sergeyenko et al. (2013) ont montré une perte synaptique progressive chez la souris entre 4 et 144 semaines, et ce bien avant les changements des seuils auditifs. Les fibres nerveuses les plus fragile étaient les fibres à basse activité spontanée codant pour les sons les plus forts. Cette neuropathie sélective explique pourquoi les seuils auditifs ne sont pas affectés. Selon Sergeyenko et al. (2013), l'augmentation du ratio amplitude onde V du PEA/amplitude onde I du PEA au cours du vieillissement pourrait refléter une augmentation du « gain central » observé après déafférentation partiel en périphérie (Schaette and McAlpine, 2011).



**Figure 2.15 : Altération anatomo-fonctionnelle de la cochlée au cours du vieillissement (adapté de Sergeenko et al., 2013).** En noir, le pourcentage de cellules en fonction de l'âge de l'animal (100% est le nombre de cellule à l'âge de 0 semaine) : les CCI sont représentées en rond (=IHC), les CCE en losange (=OHC), les neurones du ganglion spiral en carré (=SGN). En bleu, le décalage des seuils auditifs mesurés électrophysiologiquement en PEA (=ABR) est représenté par un triangle pointé vers la droite, tandis que le décalage des seuils des PDAs (=DPOAE) est représenté par un triangle pointé vers la gauche. L'axe des abscisses représentent l'âge de l'animal (souris) en semaines. Notons que l'audiogramme est normal (les décalages de seuils auditifs des PEA et des PDAs sont à 0) en dépit d'une perte de 20% neurones du ganglion spiral à environ 70 semaines.

#### 2.4.2.2. Presbyacousie striatale

Dans la presbyacousie métabolique (dite aussi striale), la perte auditive est présente sur toutes les fréquences de l'audiogramme. La surdité liée à l'âge est causée par l'atrophie de la strie vasculaire. Des études réalisées à partir d'os temporaux de rocher humain montre une perte de 30% ou plus du tissu de la strie vasculaire (Pauler et al., 1988), d'où le terme presbyacousie striatale. Chez la gerbille, la dégénérescence de la strie vasculaire débute avant une augmentation significative des seuils auditifs (Gratton and Schulte, 1995). Enfin, des dommages de la

strie vasculaire sont aussi observées chez la souris SAMP8, qui présente un vieillissement accéléré et une presbyacousie présence (Menardo et al., 2012).

**Tableau 2.2 : Gènes de susceptibilité au vieillissement cochléaire.**

<b>Gène</b>	<b>Produits</b>	<b>Transmission</b>	<b>Lignées</b>	<b>Références</b>
<b>Susceptibilité au vieillissement cochléaire</b>				
ApoE KO	Apolipoprotéine E	Homozygote	C57BL/6	Guo et al., 2005
Ahl2	Inconnu	Homozygote	NOD/LtJ	Johnson and Zheng, 2002
Ahl3	Inconnu	Homozygote	C57BL/6	Nemoto et al., 2004
Brn4 KO	Facteur de Transcription lié à l'X	Hémizygote	129/C57BL/6	Xia et al. (2002) ; Minowa et al. (1999)
DRASIC KO	Canal mécanorécepteur	Homozygote	C57BL/6/129	Hildebrand et al., 2004
PolgA KO	Polymérase ADN Mitochondrial	Homozygote	129/ICR	Kujoth et al., 2005
nAChR $\beta$ 2 KO	Récepteur ACh Nicotinique	Homozygote	C57BL/6	Bao et al., 2005
mt-Tr	ARN Mitochondrial	Maternelle	A/J	Johnson et al., 2001
Pmca2 <sup>dfw</sup>	ATPase 2	Hétérozygote	BALB/cBy	Noben-Trauth et al., 1997
Pcdh15 <sup>av-3J</sup>	Protocadhérine 15	Hétérozygote	C57BL/6	Zheng et al., 2005
<b>Susceptibilité au bruit et au vieillissement cochléaire</b>				
Cdh23 <sup>ahl</sup>	Otocadhérine	Homozygote	C57BL/6, others	Davis et al., 2001
Cdh23 <sup>v</sup>	Otocadhérine	Hétérozygote	CBA/?	Holme and Steel, 2004
Pmca2 KO	ATPase 2	Hétérozygote	129/BIsw/C3H	Davis et al., 2003
SOD1 KO	Superoxide dismutase	Homozygote	129/CD1, C57BL/6	Keithley et al., 2005
GPx1 KO	Glutathione peroxidase	Homozygote	129/C57BL/6	Ou et al., 2000b
TRPV4 KO	Mechanically activated ion channel	Homozygote	C57BL/6	Tabuchi et al., 2005
Cp KO	Ceruloplasmin	Homozygote	C57BL/6	Ohlemiller et Gagnon, 2007



## 3. Matériel et Méthodes

### 3.1. Animaux

**Gerbilles.** Les expériences ont été menées chez des gerbilles de Mongolie adultes femelles provenant du centre d'élevage Charles River (L'Arbresle, France). Les gerbilles étaient livrées à l'Institut des Neurosciences de Montpellier (INM) à l'âge d'un mois et étaient hébergées au sein de l'animalerie de l'Institut des Neurosciences de Montpellier pendant 2 mois maximum. Tous les tests étaient réalisés pendant cette période de 2 mois, l'âge des gerbilles ne dépassant donc pas 3 mois.

**Rats :** Les rats adultes femelles provenant du centre d'élevage Janvier-Laboratoire étaient initialement livrés et hébergés dans l'animalerie de Centre de Neurosciences de Paris Sud (CNPS). Lorsque les animaux avaient atteint l'âge requis pour les expériences (9, 15, ou 21 mois), ils étaient convoyés du CNPS à l'INM par un transporteur agréé (Sanitrans). Les rats étaient alors hébergés dans l'animalerie de l'Institut des Neurosciences de Montpellier (INM) pendant 1 mois maximum et jusqu'au jour de l'exploration fonctionnelle. Ces expériences ont été menées dans le cadre d'une collaboration scientifiques entre l'INM et le CNPS dans le cadre d'un projet financée par une ANR intitulée DAILYNOISE.

L'animalerie de l'Institut des Neurosciences de Montpellier possède l'agrément du Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (B-34 172 36 -11 Mars 2010). Toutes les expériences ont été conduites dans le souci de minimiser le nombre et la souffrance des animaux.

### 3.2. Préparation des drogues

Deux types de drogues ont été utilisés chez la gerbille. L'ouabaine (Sigma, St. Louis, MO, USA), molécule connue pour son inhibition de la pompe Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase (Schmiedt et al., 2002), était diluée avant chaque utilisation dans de la périlymphe artificielle pour atteindre une concentration finale de 33 µM. La tétrodotoxine (TTX, LATOXAN), neurotoxine connue pour bloquer de manière très sélective le pore des

canaux sodium voltage-dépendants (Katsuki et al., 1966), a été diluée dans la périlymphe artificielle pour une concentration finale de 1 et 3  $\mu\text{M}$ . La composition de la périlymphe artificielle était la suivante : 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 2 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; 11 mM glucose; pH 7,4; osmolarité ( $304 \pm 4,5$  mOsm/kg). Les expériences menées chez les rats n'ont fait l'objet d'aucune étude pharmacologique.

### 3.3. Implantation des électrodes et application des drogues

Pour limiter le nombre et la durée des actes chirurgicaux, une électrode d'enregistrement était implantée à demeure dans la niche de la fenêtre ronde, puis reliée à un connecteur fixé sur le crâne de l'animal. À l'occasion de cette chirurgie, une drogue pouvait être appliquée dans la niche de la fenêtre ronde.

Les gerbilles étaient endormies avec un mélange de Rompun à 2% (3 mg/kg) et de Zolétil 100 (40 mg/kg) injecté par voie intra péritonéale. L'approche de la cochlée était réalisée par un abord dorsal. Après avoir rasé et nettoyé le crâne de l'animal avec un antiseptique (Bétadine®), la peau était incisée derrière le pavillon de l'oreille gauche pour mettre en évidence la bulle tympanique. Une fois dégagé et séché, l'os de la bulle tympanique était ouvert à l'aide d'un scalpel au niveau de sa paroi supérieure. Une électrode boule d'enregistrement, préparée à partir d'un fil de platine gainé de Téflon (0,13 mm de diamètre, Phymep, France), était ensuite placée au contact de la niche de la fenêtre ronde à l'aide d'un micromanipulateur (Warner Instruments). Pour conserver cette électrode en place pendant plusieurs jours, celle-ci était fixée au niveau de la bulle tympanique avec de la résine dentaire (Réf. 4920A2, 3M ESPE). Après avoir placé une électrode de référence dans les muscles de la nuque de l'animal, une première série de mesures était réalisée en per-opératoire. Les seuils et l'amplitude des réponses cochléaires étaient alors contrôlés.

À ce stade, une drogue (Ouabaïne ou TTX) pouvait être appliquée dans la niche de la fenêtre ronde. Elle était introduite dans une pipette de perfusion en verre (0,1 mm de diamètre à la pointe) placée au-dessus de la niche de la fenêtre ronde. Connectée à un pousse seringue électrique (Warner Instruments), cette pipette de perfusion permettait de délivrer la drogue dans la niche de la fenêtre ronde à une



vitesse programmée de 0.2 ml/h, pendant 30 minutes pour l'ouabaïne, et 20 mn pour la TTX. Après application, la drogue était retirée de la niche de la fenêtre ronde à l'aide d'une petite boule de coton. Une seconde série de mesure pouvait alors être réalisée pour étudier l'effet immédiat de la drogue appliquée.

Pour tous les animaux implantés, la bulle tympanique était ensuite séchée et refermée avec de la résine dentaire de manière à garder une extrémité de l'électrode d'enregistrement en contact avec la niche de la fenêtre ronde, et l'autre extrémité en dehors de la bulle tympanique. Une incision était ensuite effectuée sur le crâne de l'animal afin d'y fixer un connecteur. Après avoir gratté le périoste de l'os, cette zone était soigneusement séchée et légèrement érodée avec du nitrate d'argent. Les électrodes (active et de référence) étaient ensuite glissées sous la peau jusqu'à l'ouverture effectuée sur le crâne, afin d'y être soudées au connecteur (fiche femelle à 4 voies, HARWIN). Le connecteur était alors fixé sur le crâne de l'animal avec de la résine dentaire. Pour finir, les plans musculaires et cutanés étaient suturés avec du fil résorbable et recouverts avec un antiseptique (Bétadine®). Après cette chirurgie, les animaux étaient laissés au repos pendant une semaine avant de commencer les procédures d'exploration fonctionnelle.

### 3.3. Exploration fonctionnelle

Avant chaque expérimentation, les gerbilles étaient endormies avec un mélange de Rompun à 2% (3 mg/kg) et de Zolétil 100 (40 mg/kg) injecté par voie intra péritonéale. Cette anesthésie présentait l'avantage de se dissiper rapidement et pouvait être maintenue pendant plusieurs heures grâce à l'injection régulière (toutes les deux heures) du tiers de la dose initiale. Toutes les procédures étaient ensuite réalisées dans une chambre anéchoïque insonorisée. La température corporelle des animaux était maintenue à  $38 \pm 1^\circ\text{C}$  au moyen d'une couverture chauffante rétro-contrôlée par une sonde rectale (Homeothermic blanket control unit 7137, Phymep). Pour assurer le dégagement des voies respiratoires des animaux, leur tête était positionnée dans un appareil de contention non invasif fabriqué dans le laboratoire.

### 3.3.1. Produits de distorsion acoustiques

L'amplification mécanique non linéaire, créée par l'activité des CCE, a été étudiée à travers l'enregistrement des produits de distorsion acoustiques. Deux sons de fréquences primaires  $f_1$  et  $f_2$  étaient générés simultanément par le logiciel Cubdis HID 40133DP (Mimosa Acoustics, Champaign, IL, USA), et délivrés dans le conduit auditif externe par une sonde ER-10C S/N 2525 (Etymotic Research Inc. Elk Grove Village, IL, USA) possédant deux hauts parleurs miniatures. Les mécanismes actifs étaient explorés le long de l'axe tonotopique en faisant varier la fréquence  $f_2$  de 500 Hz à 20 kHz, par pas de 1/4 d'octave, en gardant un rapport de fréquence  $f_2/f_1=1,2$ . Les fréquences primaires  $f_1$  et  $f_2$  étaient émises à 60 et 55 dB SPL (réf. 20  $\mu$ Pa), respectivement. Un microphone miniature inclus dans la sonde intra-auriculaire, permettait d'enregistrer les produits de distorsion acoustiques. Le pic de distorsion cubique  $2f_1-f_2$  et le bruit de fond environnant ont été mesurés en fonction de la fréquence  $f_2$ . Ce pic de distorsion cubique présente l'avantage d'être le pic de distorsion le plus ample aux fréquences plus graves que les fréquences primaires, ce qui permet d'explorer la cochlée dans les fréquences aigues.

### 3.3.2. Potentiels cochléaires

Les potentiels cochléaires étaient recueillis par simple branchement au connecteur placé sur le crâne de l'animal pendant l'implantation des électrodes (section 3.2). La génération et l'acquisition des signaux étaient assurées par une carte d'analyse de signaux dynamiques à deux entrées et deux sorties (National Instruments® PXI-4461, 200 kHz/canal, 120 dB de dynamique), contrôlée par des interfaces créées au laboratoire sous LabVIEW (National Instruments®). Les signaux étaient générés à une cadence de 200 000 échantillons/sec, tandis que l'acquisition était réalisée à 50 000 échantillons/sec pour l'enregistrement de l'activité synchrone (PAC, PSTR et activité unitaire) et à 8000 échantillons/sec pour l'enregistrement de l'activité soutenue du nerf auditif (bruit de fond cochléaire spontané et évoqué). Les stimulations sonores étaient délivrées en champ libre par l'intermédiaire d'un haut-parleur (James B. Lansing Sound, Los Angeles, CA, USA) placé à 10 cm de l'oreille testée. La calibration du système acoustique était réalisée à l'aide d'un microphone

1/4 de pouce (Bruel et Kjaer) relié à un analyseur de spectre (HP 3561A) préalablement étalonné en dB SPL (référence 20  $\mu$ Pa efficace).

### *3.3.2.1. Potentiel d'action composite du nerf auditif (PAC)*

Le potentiel d'action composite (PAC) du nerf auditif était mesuré en réponse à une bouffée tonale (enveloppe trapézoïdale, durée=10 ms, temps de montée= temps de descente=1 ms, cadence=11 présentations par seconde, polarité alternée, 100 présentations/niveau). Les réponses cochléaires étaient amplifiées (x 20000) et filtrées (32 - 35000 Hz) à l'aide d'un amplificateur différentiel de type Grass P511 (Astro-Med Inc., West Warwick, RI, USA). Les seuils audiométriques du PAC ont été évalués pour des bouffées tonales émises à 2, 4, 8, 16, 25 et 32 kHz. Le niveau de stimulation était progressivement augmenté par pas de 5 dB jusqu'à déterminer le plus petit niveau de stimulation générant une amplitude  $N_1$ - $P_1$  supérieure à 2  $\mu$ V. De plus, à 4, 8, 16 et 32kHz, l'amplitude  $N_1$ - $P_1$  du PAC a été mesurée pour des niveaux de stimulation allant de 0 à 80 dB SPL par pas de 5 dB.

### *3.3.2.2. Activité soutenue du nerf auditif*

L'activité soutenue du nerf auditif a été évaluée suivant l'approche décrite par Dolan et ses collaborateurs (Dolan et al., 1990). L'activité soutenue était évaluée pendant l'émission de bandes de bruit tiers d'octave (bruit blanc de loi de distribution uniforme centrée, traité par un filtre passe-bande Butterworth d'ordre 4). Les bandes de bruit tiers d'octave étaient émises en continu pendant 20 secondes, pour des fréquences centrales de stimulation allant de 2 à 32 kHz, et des niveaux de stimulation progressant de 0 à 60 dB SPL par pas de 10 dB. La densité spectrale de puissance (DSP) de l'activité cochléaire était ensuite évaluée avec une analyse de Fourier glissante par bloc (8000 échantillons/sec, 2000 échantillons par bloc, pondération de Hamming, moyennage sur 50 blocs consécutifs, résolution spectrale de 4 Hz). La densité spectrale de puissance était exprimée en  $dB\mu V/\sqrt{Hz}$  (référence : 1  $\mu$ V de tension efficace). La DSP spontanée du nerf auditif était évaluée en absence de stimulation sonore.

### 3.3.2.4. Enveloppe temporelle de la réponse neurale

La qualité de l'encodage neuronal de l'enveloppe temporelle d'un son a été évalué en stimulant l'animal avec bande de bruit étroite (bande passante : 1/3 d'octave),  $N(t)$ , centrée sur une fréquence porteuse ( $FP = 4$  ou  $16$  kHz pour la gerbille,  $8$  kHz pour les rats), modulée en amplitude avec une fréquence de modulation ( $FM = 2, 4, 8, 16, 32, 64$  ou  $128$  Hz), avec une profondeur de modulation ( $PM = 0, 20, 40, 60, 80$  ou  $100\%$ ). Le stimulus sonore  $s(t)$  était généré à l'aide de la formule :

$$s(t) = A \times \left( \left( 1 - \frac{PM}{2} \right) + \left( \frac{PM}{2} \right) \times \sin(2\pi FMt) \right) \times N(t)$$

dans laquelle la valeur du paramètre d'amplitude  $A$  permettait d'ajuster le niveau sonore de crête. Chaque stimulus sonore était présenté en continu pendant 20 secondes. Les réponses cochléaires étaient filtrées dans la bande passante 300-1200 Hz afin d'isoler la composante nerveuse de la réponse globale (Dolan et al., 1990; Cazals and Huang, 1996). Le signal était ensuite redressé et lissé (filtre lisseur de durée 1 ms) afin d'isoler l'enveloppe de la réponse. Un moyennage synchronisé avec la fréquence de modulation a permis ensuite de faire apparaître la réponse sur une ou plusieurs périodes du signal d'enveloppe. Notons que pour cette mesure, le nombre de moyennages utilisés pour faire apparaître la réponse moyennée décroît avec la fréquence de stimulation puisque la durée du stimulus était fixe et égale à 20 s. L'indice de synchronisation de la réponse neuronal a été calculé à partir du spectre de la réponse. En effet, si une réponse est modulée en amplitude par une composante sinusoïdale de fréquence  $FM$ , une raie centrée sur  $FM$  sera présente dans le spectre de la réponse (Joris et al., 2004). Pour calculer l'indice de synchronisation, il suffit alors de normaliser la valeur efficace de la raie spectrale centrée sur la fréquence  $FM$  par la valeur efficace totale de la réponse. Plus cet indice sera proche de 1, plus la réponse sera modulée en amplitude et inversement, plus il sera proche de 0, moins la réponse sera modulée par le stimulus.

## 3.4. Investigation morphologique

Les animaux étaient décapités sous anesthésie profonde au pentobarbital sodique (50 mg/kg). Les cochlées étaient rapidement prélevées et fixées dans une solution à 4% de paraformaldéhyde dans du tampon phosphate salin (tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 ; NaCl 0,9%). Les observations d'immunocytochimie ont été effectuées sur le plateau d'imagerie MRI de l'Institut des Neurosciences de Montpellier.

### 3.4.1. Immunohistochimie

Après fixation au paraformaldéhyde (30 minutes), les cochlées étaient rincées dans le tampon phosphate salin (PBS) et disséquées afin d'ôter la capsule otique, le ligament spiral, la strie vasculaire et la membrane tectoriale. Les tours étaient ensuite séparés selon un axe horizontal afin de donner des préparations de surface d'organe de Corti. Celles-ci étaient incubées toute la nuit à 4°C avec deux anticorps primaires monoclonaux de souris d'isotypes différents. Le premier anticorps était une IgG1 dirigée contre CtBP2 (BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA). Cet anticorps anti-CtBP2, dilué au 1/500<sup>ème</sup>, reconnaît à la fois le co-répresseur de transcription CtBP2, situé dans le noyau des CCI, et le domaine B de RIBEYE, un composant des rubans présynaptiques. Le second anticorps était une IgG2a, dirigée contre la sous-unité GluA2 des récepteurs AMPA (clone 6C4, Millipore, Billerica, MA, USA). Il a été utilisé à une dilution au 1/200<sup>ème</sup>. Après incubation avec les anticorps primaires (une nuit à 4°C sous légère agitation), les préparations d'organe de Corti étaient rincées dans le PBS, puis incubées 2 heures à température ambiante avec un couple d'anticorps secondaires fabriqués chez la chèvre (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et dirigés les uns contre les IgG1 de souris et les autres contre les IgG2a de souris. Les anticorps anti-IgG1 étaient conjugués au fluorochrome Alexa 488 et les IgG2a à l'Alexa 594. Ils ont été utilisés à une dilution au 1/1000<sup>ème</sup>. Après trois rinçages dans le PBS, les préparations étaient montées sur une lame de microscope en verre avec un milieu de montage fluorescent (Dako North America, Inc, USA).

### 3.4.2. Imagerie confocale

L'acquisition des images a été effectuée à l'aide d'un microscope laser confocal (Microscope inverse 1 Zeiss AxioObserver / LSM 5 LIVE DUO), de l'apex à la base de la

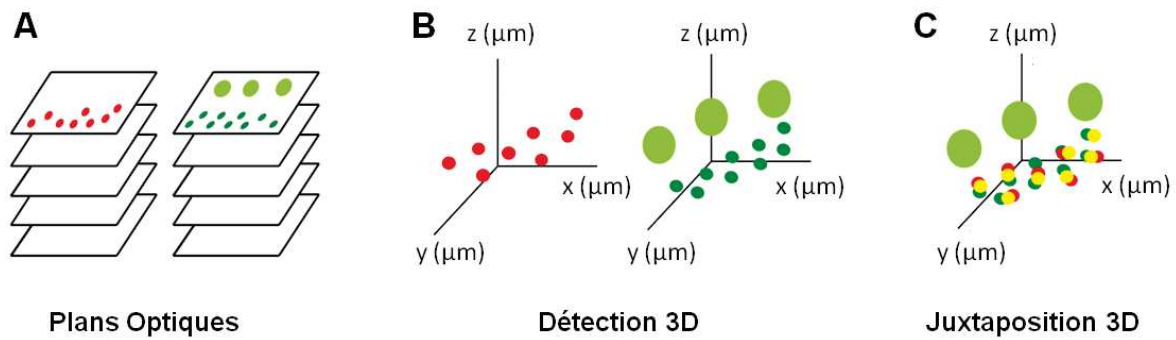
cochlée. Le nombre de synapses par CCI n'étant pas constant le long de la cochlée (Meyer et al., 2009), douze à quatorze points de mesure équidistants (saut régulier de 70 CCI soit  $\sim 700 \mu\text{m}$  d'après (Tarnowski et al., 1991) ont été considérés tout le long de la rangée des CCI en partant de l'apex. Réalisée à haute résolution (x63, zoom 2), chaque prise d'image regroupait en moyenne 7 CCI. Le pôle baso-latéral de ces CCI était entièrement numérisé par pas de  $0,4 \mu\text{m}$  en z, du faisceau spiral interne au-dessous des CCI, jusqu'au-dessus du ruban synaptique le plus apical dans la région supranucléaire de la cellule. Les séquences d'images ainsi obtenues (16 à 30 plans focaux par point de mesure) étaient ensuite importées dans le logiciel de traitement ImageJ (Wayne S Rasband, <http://imagej.nih.gov/ij/>) afin d'extraire les images par plan et par canal.

### 3.4.3. Reconstruction 3D

Les images ont été traitées à l'aide du logiciel Matlab et de sa toolbox "image processing". Pour commencer une projection 2D était effectuée par superposition de tous les plans optiques obtenus en z (**Figure 3.1A**). Cette projection nous permettait de sélectionner la zone d'étude en rejetant les CCI situées sur les bords de l'image (pour lesquelles une partie des synapses risquait d'être hors-champ).

Au sein de la zone étudiée (6 - 7 CCI au centre de la prise d'image), les structures anatomiques recherchées apparaissaient dans les images confocales sous la forme d'amas de voxels adjacents d'intensité forte. Pour détecter ces amas, nous avons développé un algorithme de classification ascendant hiérarchique qui agrège, de proche en proche, les voxels en contact latéral. Cet algorithme commence tout d'abord par agréger les voxels voisins (voxels qui partagent une face) ; dès que l'algorithme commence à agréger des voxels distants (voxels qui ne partagent par une face), le programme informatique considère que l'amas de voxels est circonscrit et clos. Appliqué séparément sur le canal vert et sur le canal rouge, cet algorithme permet donc de détecter indépendamment les noyaux cellulaires, les rubans synaptiques et les densités de récepteurs (**Figure 3.1B**). Dans cette étude, les seuils en intensité ont été déterminés qualitativement par l'expérimentateur sur le canal rouge

et le canal vert pour retenir les voxels les plus intenses. Le choix des seuils était guidé par l'histogramme des intensités. Pour détecter la juxtaposition d'un ruban synaptique et d'une densité de récepteurs, nous avons utilisé la propriété de diffusion des marqueurs synaptiques qui tend à marquer la structure cible bien au-delà de ses limites anatomiques. En combinant les canaux vert et rouge, la juxtaposition apparaît donc en jaune (**Figure 3.1C**). La détection du nombre de synapses dites « complètes » peut ensuite se faire avec l'algorithme de classification hiérarchique ascendant appliqué au canal mixte jaune. Menée pour chaque point de mesure, cette procédure permet d'évaluer le nombre de synapses à ruban par CCI.



**Figure 3.1 : Méthode de détection illustrée sur des données simulées.** **A.** Les canaux rouge et vert des plans optiques sont analysés par l'algorithme de détection 3D. Dans le canal vert, les noyaux des CCI sont marqués en vert pâle alors que les rubans synaptiques sont marqués en vert vif. **B.** L'algorithme de détection appliqué séparément sur le canal rouge et le canal vert permet de circonscrire les contours des densités de récepteurs, des noyaux cellulaires et des rubans synaptiques. Dans cet exemple on distingue : 8 densités de récepteurs en rouge, 3 noyaux cellulaires en vert pâle et 9 rubans synaptiques en vert vif. **C.** Après fusion des canaux rouge et vert, l'algorithme détecte 8 synapses complètes (en jaune).

### 3.5. Analyse des données

Toutes les données ont été analysées à l'aide du logiciel Matlab (MathWorks company) et de ses boîtes à outils *Statistics* et *Curve Fitting* toolboxes.



### 3.5.1. Indice de synchronisation

L'indice de synchronisation aussi appelé *vector strength* peut être calculé de différentes façons suivant que la nature des réponses analysées à savoir un train de potentiels d'action (activité unitaire, Goldberg and Brown, 1969) ou une activité électrique de champ (type activité globale, Joris et al., 2004). Dans le second cas, qui correspond à notre situation expérimentale, l'indice de synchronisation peut être déterminé simplement à partir du spectre de la réponse. En effet, si une réponse est modulée en amplitude par une composante sinusoïdale de fréquence FM, une raie centrée sur FM sera présente dans le spectre de la réponse (Joris et al., 2004). Pour calculer l'indice de synchronisation, il suffit alors de normaliser la valeur efficace de la raie spectrale centrée sur la fréquence FM par la valeur efficace totale de la réponse. Plus cet indice sera proche de 1, plus la réponse sera modulée en amplitude et inversement, plus il sera proche de 0, moins la réponse sera modulée par le stimulus.

### 3.5.2. Analyse statistique

Les moyennes sont exprimées  $\pm$  une fois l'erreur standard (ou  $\pm$  une fois l'écart type si mentionné). Lorsque les conditions d'application des tests paramétriques étaient respectées (distribution normale des échantillons), la comparaison de deux groupes était effectuée à l'aide d'un test de Student, et la comparaison de plusieurs groupes était effectuée à l'aide d'un test d'analyse de variance (ANOVA à 1 facteur), complété par un test de comparaison multiple. Sinon, des tests non-paramétriques étaient réalisés : la comparaison de deux groupes était effectuée à l'aide d'un test de Wilcoxon et plusieurs groupes étaient comparés à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis, complété par un test de comparaison multiple.

## 4. Résultats

L'objectif de ce travail était de développer de nouvelles techniques électrophysiologiques capables d'évaluer l'aptitude de la cochlée à encoder des variations acoustiques d'enveloppe temporelle. Cette approche sera utilisée en complément des techniques électrophysiologiques classiques (potentiel d'action composite du nerf auditif, onde I des potentiels évoqués auditif précoces) qui évaluent la réponse synchrone des fibres en début de stimulation. L'utilisation de notre approche pourrait permettre de dépister des déficits de codage qui échappent actuellement aux outils de dépistage classiques (Bourien et al., 2014). Cette méthode a été mise au point, calibrée et validée chez la gerbille. Cette méthode a ensuite été utilisée chez le rat pour étudier plus spécifiquement l'effet du vieillissement sur les propriétés fonctionnelles des fibres du nerf auditif.

### 4.1. Réponse du nerf auditif à une bande de bruit pulsée

En audiologie expérimentale et clinique, étudier l'ensemble de la population des fibres du nerf auditif demeure une tâche difficile car les fibres diffèrent de manière importante dans leur seuil d'activation et leur degré de synchronisation. Comparées aux fibres à haute activité spontanée, les fibres à basse activité spontanée ont un seuil d'activation haut, une latence d'activation du premier potentiel d'action retardée et peu reproductible. De ce fait, elles ne sont pas détectables dans le potentiel d'action composite du nerf auditif (Bourien et al., 2014, enregistré en champ lointain). Des travaux antérieurs menés dans le laboratoire ont montré que l'utilisation de bouffées tonales ne permettait pas de mesurer la réponse des fibres à basse activité spontanée car leur réponse est peu synchronisée avec la structure fine du stimulus. L'utilisation de bandes de bruit nous a semblé plus pertinente dans la mesure où les travaux de Philip Joris et al. (1992) avaient montré que les fibres à basse activité spontanée répondent mieux que les fibres à haute activités spontanée, à des fluctuations d'enveloppe temporelle lentes dans le stimulus.

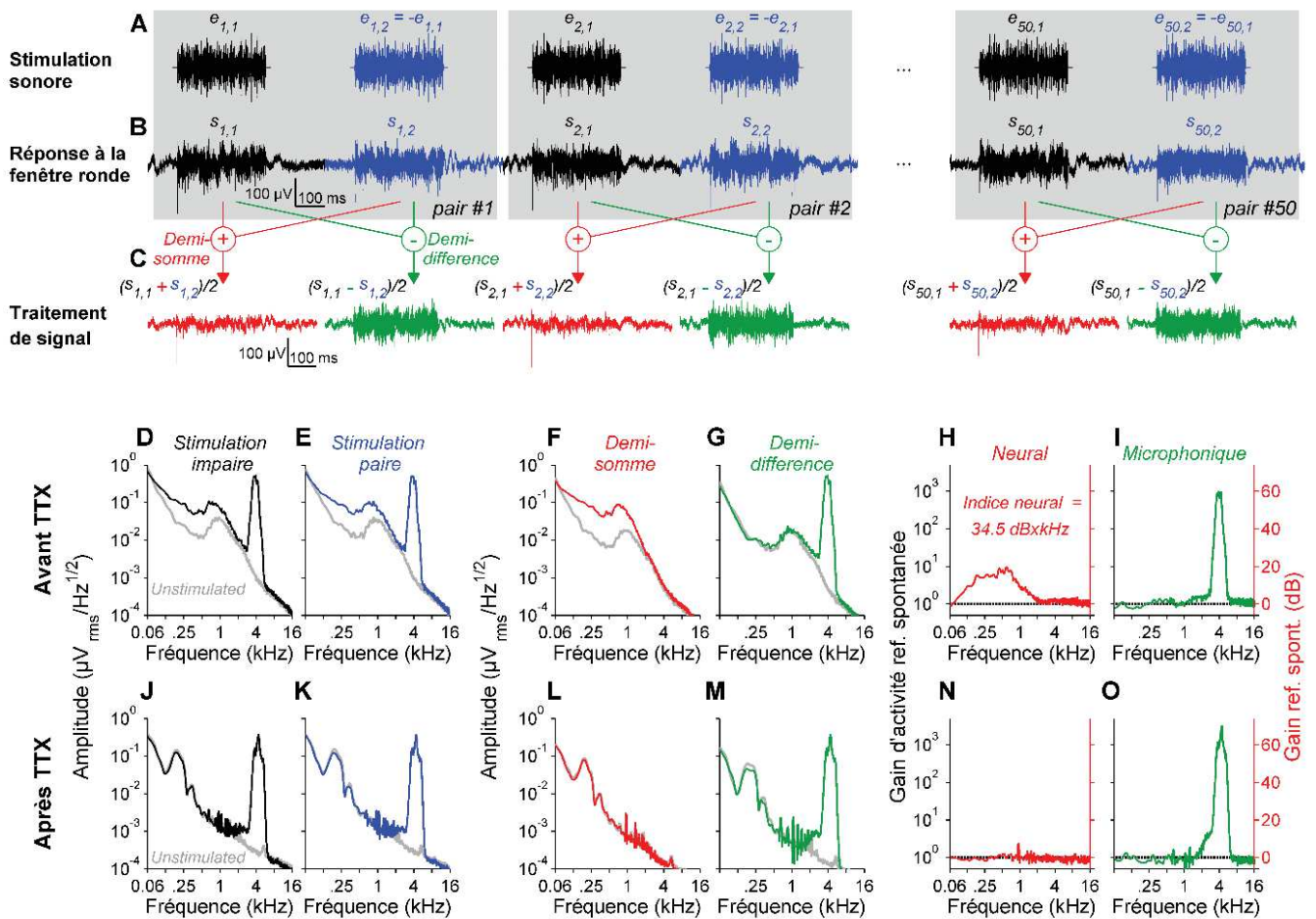
La **Figure 4.1.** illustre le protocole de stimulation et l'algorithme d'analyse des réponses chez une gerbille lorsque l'électrode de recueil était positionnée dans la niche de la fenêtre ronde. En l'absence de stimulation sonore, la densité spectrale de puissance (DSP) du bruit de fond neural est caractérisée par une amplitude minimum autour de 400 Hz et un large pic autour de 900 Hz (voir traces grises dans la **figure 4.1. D, E**) qui reflète l'activité spontanée globale des fibres du nerf auditif. La position de ce dôme à 900 Hz est liée à la durée des potentiels d'action produits par le nerf auditif qui est de l'ordre de 1 ms (soit l'inverse de 900 Hz).

#### 4.1.1. Protocole de stimulation et d'analyse

Les potentiels cochléaires ont été enregistrés en réponse à des bandes de bruit pulsées, de durée 300 ms chacune, de largeur de bande un tiers d'octave, et centrées sur une fréquence cible fixée par l'expérimentateur (**Figure 4.1.A**). La densité spectrale de puissance a été évaluée pendant les 200 dernières millisecondes de la réponse cochléaire pour exclure la réponse synchrone et la phase d'adaptation. Afin d'extraire l'activité neurale et l'activité microphonique qui reflètent respectivement l'activité du nerf auditif et l'activité des cellules ciliées externes, nous avons utilisé des paires répétées de bruit de polarité inversée. Deux paires consécutives étaient en revanche différentes les unes des autres de par leur structure temporelle (**Figure 4.1.A et B**). Quand elle est évaluée sur le premier ou le second élément de chaque paire (traces noires et bleues dans les **Figure 4.1.A et B**, respectivement), la DSP est caractérisée par un mélange des deux composantes (**Figure 4.1.D et E**). Calculée au sein de chaque paire, la demi-somme réduit de façon drastique le potentiel microphonique, isolant ainsi la composante neurale (traces rouges dans **Figure 4.1.C** et sa DSP dans **Figure F**). A l'opposé, le calcul de la demi-différence au sein de chaque paire isole préférentiellement la composante microphonique. L'amplitude du dôme à 900 Hz devient alors comparable à celle obtenue en absence de stimulation (voir traces vertes dans **Figure 4.1.C** et sa DSP dans **Figure 4.1.G**).

Le gain d'activité (neural et microphonique) évoqué par la stimulation sonore a été mesuré en divisant point par point la DSP mesurée en réponse au son par la DSP mesurée en absence de stimulation (**Figure 4.1.H et I**). Quand ce ratio est proche de 1 (soit 0 dB en gain), il n'y a pas de gain d'activité évoqué par le son. Inversement, un ratio supérieur à 1 indique un gain significatif d'activité qui peut être exprimé en dB

(voir les axes doubles dans les **Figures 4.1.H et L**). Pour vérifier l'origine neurale de cette composante, nous avons perfusé quelques gouttes d'une solution contenant de la tétrodotoxine (TTX) dans la niche de la fenêtre ronde, (TTX, 10  $\mu$ M). Le blocage de l'activation des canaux sodiques par la TTX abolit complètement la réponse, laissant la composante microphonique cochléaire non affecté (**Figures 1J-O**).



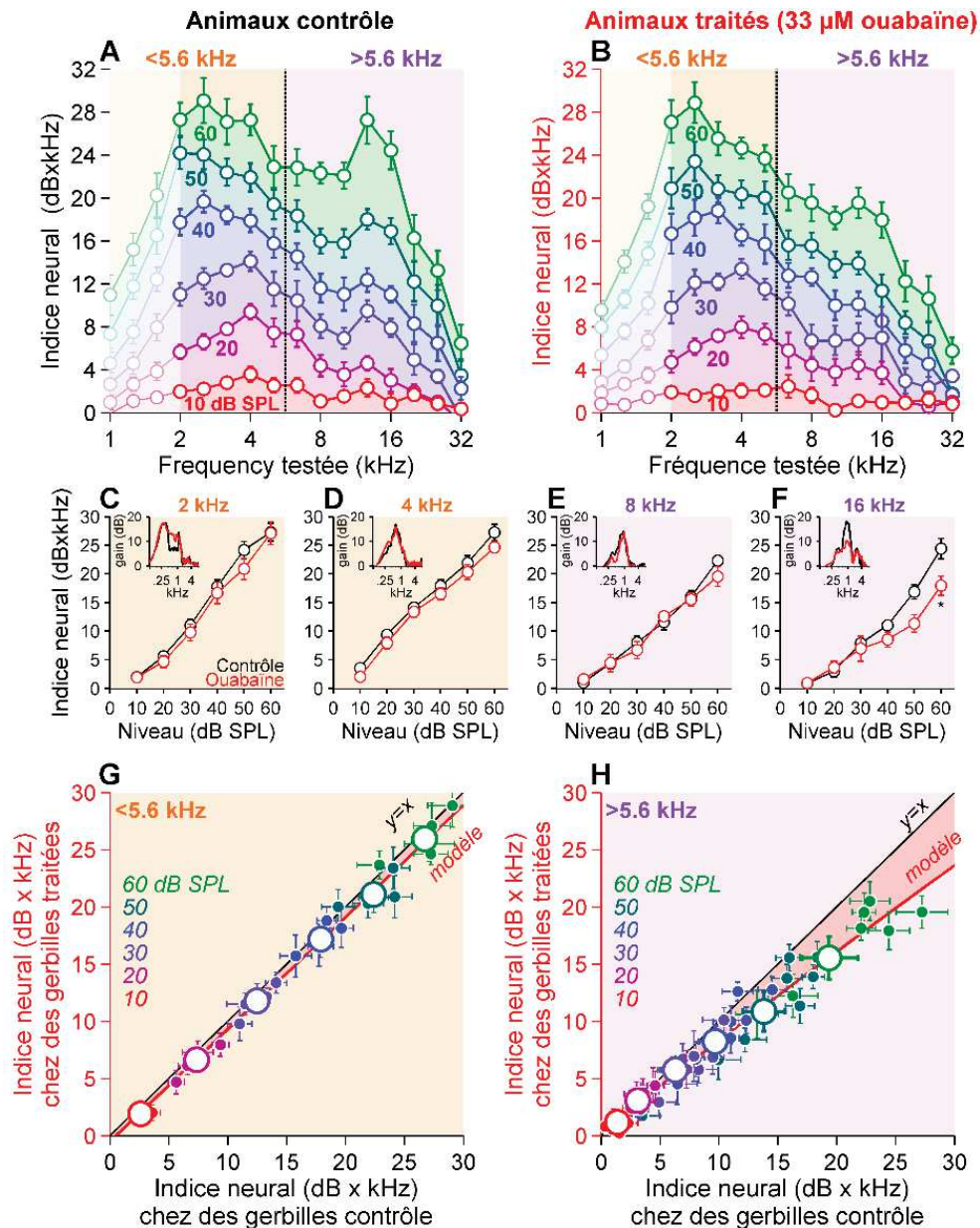
**Figure 4.1. : Extraction de l'indice neural de la réponse de la fenêtre ronde.** (A, B) Les réponses mesurées depuis la fenêtre ronde (B) étaient évoquées par des bouffées répétées de 300 ms de bande de bruit tiers d'octave (A, e) centrées sur une fréquence de test (4 kHz 50 dB SPL dans cet exemple). Pour réduire le potentiel microphonique cochléaire : i) deux stimuli consécutifs (qui forment une paire) étaient présentés en polarité opposée et ii) toutes les paires ( $n = 50$ ) différaient chacune d'entre elles. (C) La demi-somme (trace rouge) et la demi-différence (trace verte) étaient calculée pour chaque paire. (D-O) Analyse spectrale des réponses de la fenêtre ronde avant (D-I) et après l'application de 10  $\mu$ M de TTX (J-O) dans la niche de la fenêtre ronde. La trace grise est la densité spectrale de puissance du signal enregistré à la fenêtre ronde en l'absence de stimulation sonore (activité spontanée). Les traces noires et bleues (D, E) sont calculées à partir des réponses de rang pair (noir, premier élément de chaque paire) ou rang impair (bleu, second élément de chaque paire). Vous pouvez remarquer le mélange d'une composante neurale centrée autour de 900 Hz et le potentiel microphonique centré à 4 kHz. Pour séparer les composantes neurale et microphonique, l'analyse spectrale a été évaluée sur la demi-somme (red, F) ou la demi-différence (vert, G). Les activités neurale et microphonique évoquées (traces rouge et verte en H et I) ont été dérivées des traces montrées en F et G respectivement (rapport entre les traces colorées et gris). Remarquez la disparition complète de l'activité neurale après application de TTX, laissant le potentiel microphonique inchangé (J-O). La zone sous la courbe rouge dans le panneau H a été utilisée comme un indice de l'activité neurale évoquée (34.5 dBxkHz dans cet exemple).

### 4.1.2. Le gain neural reflète la distribution des fibres à basse activité spontanée

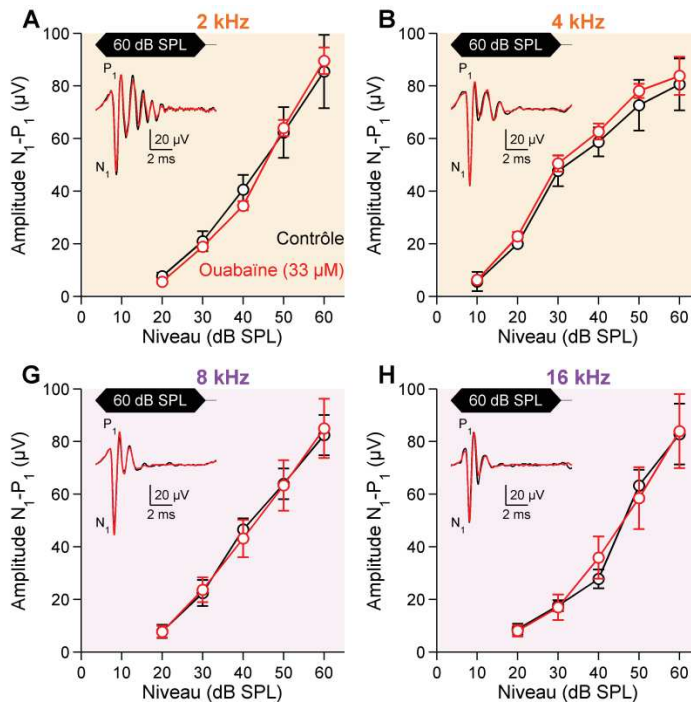
Pour proposer un indice neural caractéristique de la réponse évoquée, nous avons mesuré la surface sous la courbe du gain neural (**Figure 4.1.H**) puis nous avons affiché la valeur de cet indice en fonction de la fréquence et du niveau testés (**Figure 4.2.A**). De façon tout à fait intéressante, la réponse en fréquence de l'indice neural dépend fortement du niveau de la stimulation sonore. Pour des niveaux de stimulation bas (au-dessous de 20 dB SPL), l'indice neural prédomine dans la zone fréquentielle du 4 kHz. A 30 dB SPL, une seconde composante apparaît autour de 12 kHz. A 60 dB SPL, la courbe iso-niveau révèle une forme à 2 modes avec un pic basse-fréquence à 2.5 kHz et un pic haute-fréquence à 12.5 kHz (**Figure 4.2.A**). Même si le nombre de synapses par CCI atteint environ 20-25 synapses par CCI (voir Meyer et al., 2009) dans la région de la cochlée du 1 à 2 kHz, une réduction drastique de l'indice neural a été observée pour les fréquences testées sous 2 kHz. Cette annulation neurale peut être due à la réponse en verrouillage de phase des fibres du nerf auditif. Pour les basses fréquences de stimulation, la structure fine de la forme de l'onde suit la polarité du stimulus. Les potentiels d'action déclenchés par les fibres en réponse aux deux stimulus d'une même paire seront donc décalés de 180° (c'est-à-dire un décalage d'un demi-cycle). En champ électrique lointain, la demi-somme obtenue au sein d'une même paire annulera l'activité neurale verrouillée en phase expliquant ainsi la réduction de l'indice neural pour des stimulations inférieures à 2 kHz. Dans la suite de cette étude, nous avons uniquement retenu l'indice neural mesuré pour des stimulations supérieures à 2 kHz.

Nous avons alors testé la sensibilité de l'indice neural à la perte des fibres à basse-activité spontanée en perfusant de l'ouabaine dans la niche de la fenêtre ronde. Six jours après une perfusion de 33  $\mu$ M d'ouabaine, l'indice neural avait diminué significativement dans la zone correspondant au 12 kHz, laissant la région des fréquences inférieures à 5.6 kHz non affectée (**Figures 4.2.B-F**). Nous avons ensuite comparé deux-à-deux (c'est à dire à fréquence et niveau égaux), la valeur moyenne de l'indice neural mesuré chez les animaux traités avec de l'ouabaine avec la valeur moyenne mesurée chez les animaux contrôle. (**Figure 4.2.G et H**). Au-dessous de 5.6 kHz, le nuage de points est distribué sur la droite  $y = x$  indiquant ainsi que l'ouabaine n'a pas d'effet sur l'activité neurale dans cette gamme de fréquences (**Figure 4.2.G**). En revanche, au-dessus de 5.6 kHz (la région peuplée par les fibres à basse-AS chez la gerbille), une réduction de l'indice neural est observée spécialement pour les plus hauts niveaux de stimulation (**Figure 4.2.H**).





Pour démontrer la meilleure sensibilité de cette technique, nous avons mesuré le potentiel d'action composite du nerf auditif chez ces animaux (**Figure 4.3.**). Noter l'absence de changement significatif dans les fonctions amplitude-intensité du PAC à 2, 4, 8, et 16 kHz (**Figure 4.3.A-D**).



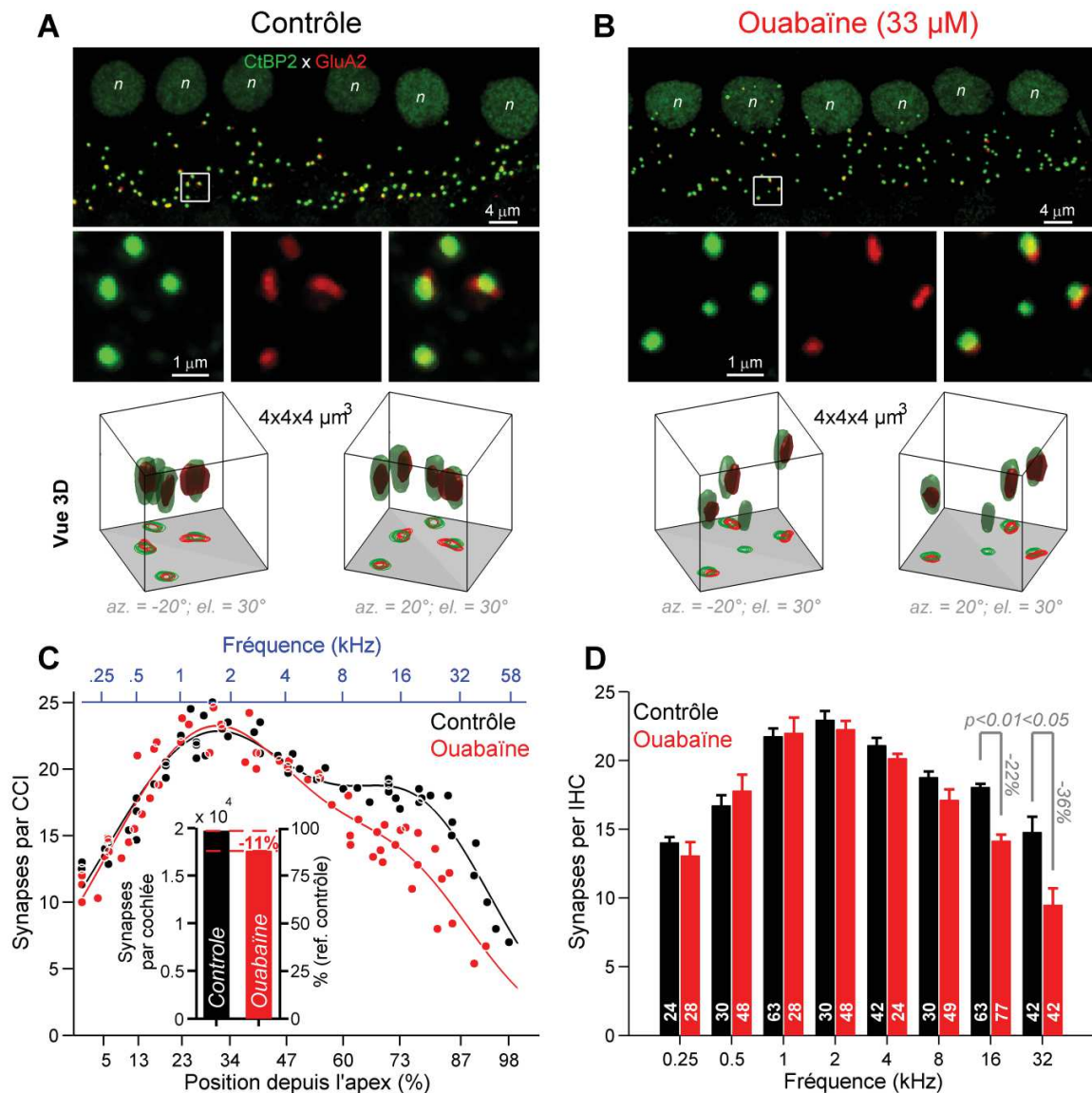
**Figure 4.3. Potentiel d'action composite du nerf auditif chez les animaux contrôles et traités avec de l'ouabaine (33 μM).** Amplitude du PAC en fonction du niveau de stimulation, en réponse à des bouffées tonales présentées à 2 (A), 4 (B), 8 (C), et 16 kHz (D) chez les animaux contrôle traités avec de la périlymphe artificielle (noir, n = 10) et chez des animaux traités avec de l'ouabaine (rouge, n = 9). Encart : Exemple de PAC chez les animaux contrôle (noir) et ouabaine (rouge). L'amplitude PAC a été mesurée entre N1 et P1. Les données sont exprimées sous la forme moyenne ± écart type. Aucune différence statistique n'a été trouvée entre les animaux contrôle et les animaux ouabaine.  $p > 0.05$ , test ANOVA à 2 facteurs.

### 4.1.3. Quantification des synapses à ruban par cellule ciliée interne

Pour démontrer que la réduction de l'indices neural dans les hautes fréquences chez les gerbilles traitées à l'ouabaine pouvait être un prédictive d'une perte de synapses dans la partie basale de la cochlée, nous avons prélevé les cochlées de 5 animaux de chaque groupe pour faire des comptages de synapses. En utilisant la technique de l'immunohistochimie, le nombre de synapses à ruban a été estimé en détectant une juxtaposition du marquage du ruban et du marquage de la densité post-synaptique (**Figure 4.4.A et B**). Dans les cochlées contrôle (n = 5), la distribution du nombre de synapses par CCI était bimodale avec un nombre important de synapses dans les régions cochléaires du 2 et du 16 kHz (**Figure 4.4.C**) qui est cohérent avec la forme bimodale de l'indice neural à 60 dB SPL (**Figure 4.4.A**). Six jours après la perfusion



de 33  $\mu$ M d'ouabaine ronde, le nombre de synapses par CCI le long de l'axe tonotopique affichait un seul mode centré sur 2 kHz (**Figure 4.4.C et D**). De façon intéressante, le nombre total de synapses diminuait de 11 % chez les cochlées perfusées par la drogue (**Figure 4.4.C** en encart), avec la plus grande réduction dans les régions cochléaires du 16 et du 32 kHz (-22% et -36%, respectivement, **Figure 4.4.D**). Ceci est cohérent avec la distribution des fibres basse-AS dans la base de la cochlée de la gerbille (Bourien et al., 2014; Huet et al., 2016).



**Figure 4.4. Comptages de synapses chez les animaux contrôle et les traités avec de l'ouabaine.** (A, B) Microscopie confocale CtBP2 (vert) et GluA2 (rouge) de la région encodant le 16 kHz chez les cochlées contrôle (A) et traitées avec de l'ouabaine (B). Panneau du haut : vue agrandie de l'innervation de cellules ciliées internes (6 CCI; n indique le noyau des CCI). Panneau du milieu : projection en z du carré blanc montré au-dessus (4  $\mu$ m  $\times$  4  $\mu$ m), qui montre l'immunomarquage CtBP2, ou GluA2, ou les deux (fusionné). Panneau du bas : Vues 3-dimensions du carré blanc montré au-dessus (4  $\mu$ m  $\times$  4  $\mu$ m  $\times$  4  $\mu$ m). Remarquez la présence d'un ruban orphelin dans la condition ouabaine (B, 12  $\pm$  2% dans le bout basal (>5.6 kHz) contre 1  $\pm$  0.6% dans le bout apical (<5.6 kHz). (C) Nombre de synapses par CCI le long de l'axe tonotopique de la gerbille (Müller, 1996) chez les cochlées contrôles et les cochlées ouabain (noir, contrôle, 5 cochlées, 324 CCI, 5790 synapses; rouge, ouabain, 5 cochlées; 344 CCI, 5494 synapses). Chaque point représente la moyenne sur 6 CCI consécutives (Bourien et al., 2014). Les courbes noires et rouges sont ajustées en utilisant la somme de deux modèles Gaussiens (contrôles, noir,  $f(x) = 22.6 \times \exp(-((x-30)/35.2)^2) + 14.2 \times \exp(-((x-78.6)/24.1)^2)$ ,  $r^2 = 0.92$ ; ouabaine, rouge,  $f(x) = 22.9 \times \exp(-((x-30)/33.4)^2) + 9.7 \times \exp(-((x-75.2)/23.6)^2)$ ,  $r^2 = 0.88$ , avec x la position à partir de l'apex en pourcentage). Encart : Evaluation du nombre de synapses par cochlée calculé à partir des comptages de CCI et synapses. (noir, contrôle : 19659 synapses/cochlée; rouge, ouabaine: 17568 synapses/cochlée). (D) Nombre de synapses par CCI groupées par bande d'octave, chez les cochlées contrôle (noir) et chez les cochlées ouabain (rouge). Les valeurs numériques indiquent le nombre de CCI pour qui le nombre de synapses fut évalué. Les données sont exprimées comme la moyenne  $\pm$  écart type,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , test ANOVA à deux facteurs suivis par un test de Tukey *post-hoc*.

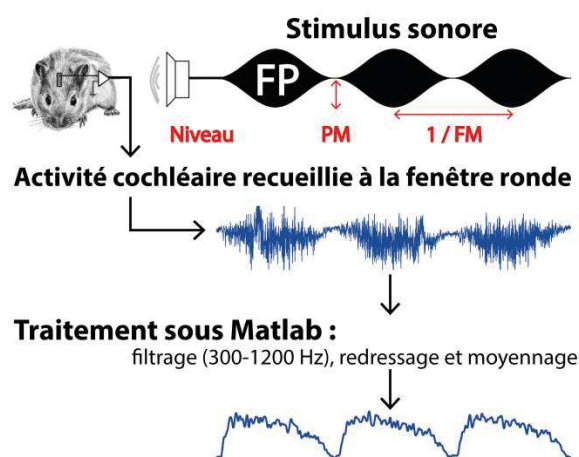
En conclusion, l'analyse des potentiels globaux enregistrés à la fenêtre ronde permet donc de détecter une perte de fibres à basse activité spontanée dans le nerf auditif. Sur le plan du dépistage des « surdités cachées », il s'agit d'une avancée importante d'autant que ces fibres sont plus vulnérables au traumatisme sonore (Furman et al., 2013) et au vieillissement (Schmiedt et al., 1996) et qu'elles échappent aux tests cliniques basés sur la réponse synchrone (ECoG et PEA). Ce travail a fait l'objet d'une publication en janvier 2017 dans la revue Plos One (Batrel C., Huet A., Hasselmann F. *et al*, 2017).

## 4.2. Réponse du nerf auditif à une bande de bruit continue modulée en amplitude

Pour aller plus loin dans l'exploration fonctionnelle du nerf auditif, nous avons analysé la réponse du nerf auditif à des bandes de bruits mais cette fois-ci modulées en amplitude plutôt que pulsées sur la gerbille normoentendante. Notre hypothèse de travail était qu'une altération du nerf auditif pouvait entraîner un déficit d'encodage observable à l'aide de ce type d'analyse.

### 4.2.1. Protocole d'analyse et de stimulation

Pour se placer dans un cadre expérimental bien contrôlé sur le plan acoustique, nous avons choisi d'utiliser des bandes de bruit étroites (afin de rester sélectif en fréquence), modulées en amplitude par une enveloppe de forme sinusoïdale (voir **figure 4.5.**). La stimulation était contrôlée par 4 paramètres : la fréquence porteuse sur laquelle était centrée la bande de bruit (FP), la profondeur de modulation (PM) et la fréquence de modulation (FM) et le niveau de stimulation. Pour extraire la réponse du nerf auditif, les potentiels cochléaires enregistrés depuis la fenêtre ronde étaient traités à l'aide d'algorithmes de traitement du signal pour isoler la composante neurale (voir **figure 4.5.**). Pour ce faire, les potentiels cochléaires étaient tout d'abord filtrés par un filtre passe-bande de bande passante comprise entre 300 et 1200 Hz pour isoler la composante neurale centrée sur le 900 Hz. Ce signal était ensuite redressé, moyenné, lissé (fenêtre de 6% de la période de modulation) pour extraire l'enveloppe temporelle de la réponse du nerf auditif (**Figure 4.5.**).

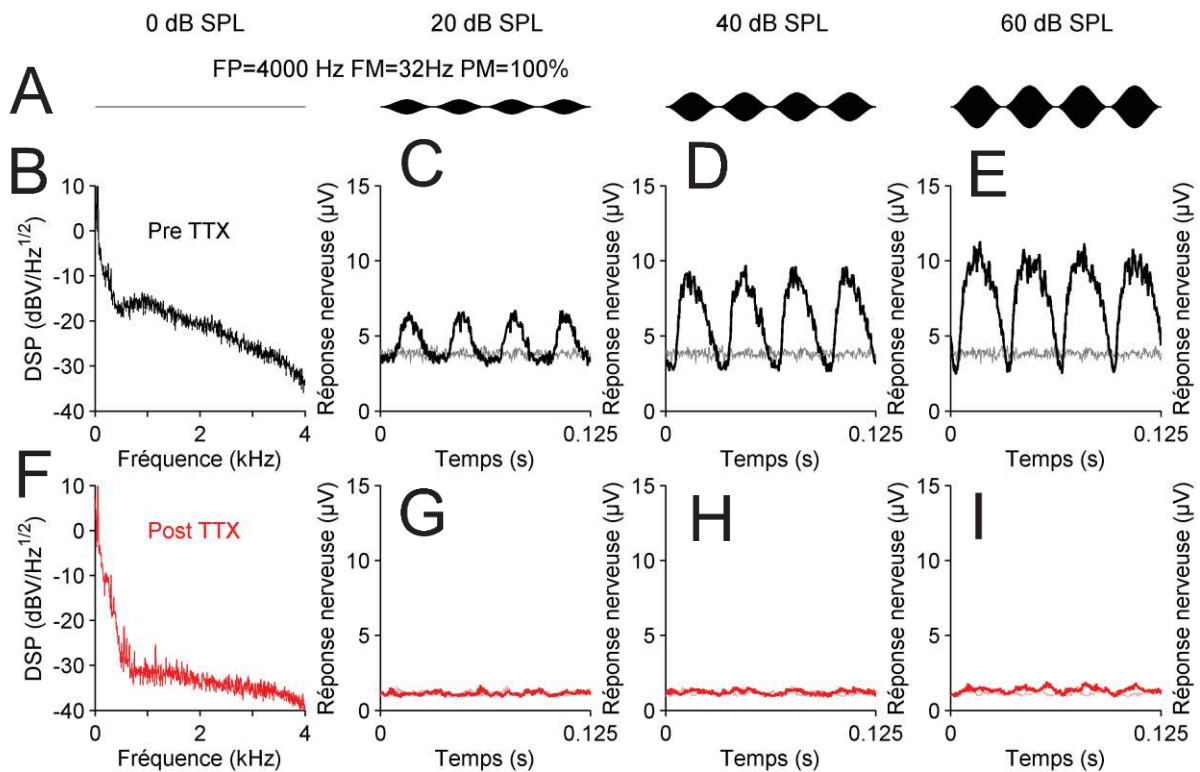


**Figure 4.5: Méthode d'enregistrement de la réponse du nerf auditif à une bande de bruit continue modulée en amplitude.** En haut en noir, la stimulation : bande de bruit 1/3 d'octave centrée sur 4 kHz, niveau de crête 60 dB SPL, modulée en amplitude avec une fréquence de modulation FM = 8 Hz et une profondeur de modulation PM = 100%. En bleu, le signal recueilli puis traité sous Matlab. Le filtrage dans la bande 300-1200 Hz permet d'isoler l'activité neurale de l'activité sensorielle. L'étape de redressement, moyennage, lissage permet de détecter l'enveloppe de la réponse neurale.

#### 4.2.2. Origine nerveuse de la réponse

Pour s'assurer que cette réponse reflète la réponse du nerf auditif et pas celle des cellules sensorielles qui se dépolarisent elles aussi pendant la stimulation sonore (Dallos and Harris, 1978), nous avons appliqué de la TTX diluée dans de la périlymphe artificielle (concentration 3  $\mu\text{M}$ ) dans la niche de la fenêtre ronde de l'animal pour bloquer le déclenchement des potentiels d'action. La **figure 4.6** montre les résultats obtenus chez une gerbille avant et 30 min après application de TTX.

Alors que la densité spectrale de puissance de l'activité spontanée avant application de TTX exhibe un dôme centré sur le 900 Hz, l'application de TTX réduit significativement ce dôme (**Figure 4.6**). En réponse à des bandes de bruit modulées dont le niveau crête varie de 20 à 60 dB SPL, les tracés obtenus après TTX sont plats alors que les tracés obtenus avant exhibent très clairement une réponse verrouillée en phase avec l'enveloppe du stimulus. Il est aussi intéressant de noter une diminution significative de l'activité spontanée après application de TTX (~4  $\mu\text{V}$ , avant TTX ; 1  $\mu\text{V}$ , 30 mn après TTX). Cette expérience de contrôle qui confirme l'origine nerveuse de la réponse nous a permis d'aller plus en avant dans le développement de la méthode.

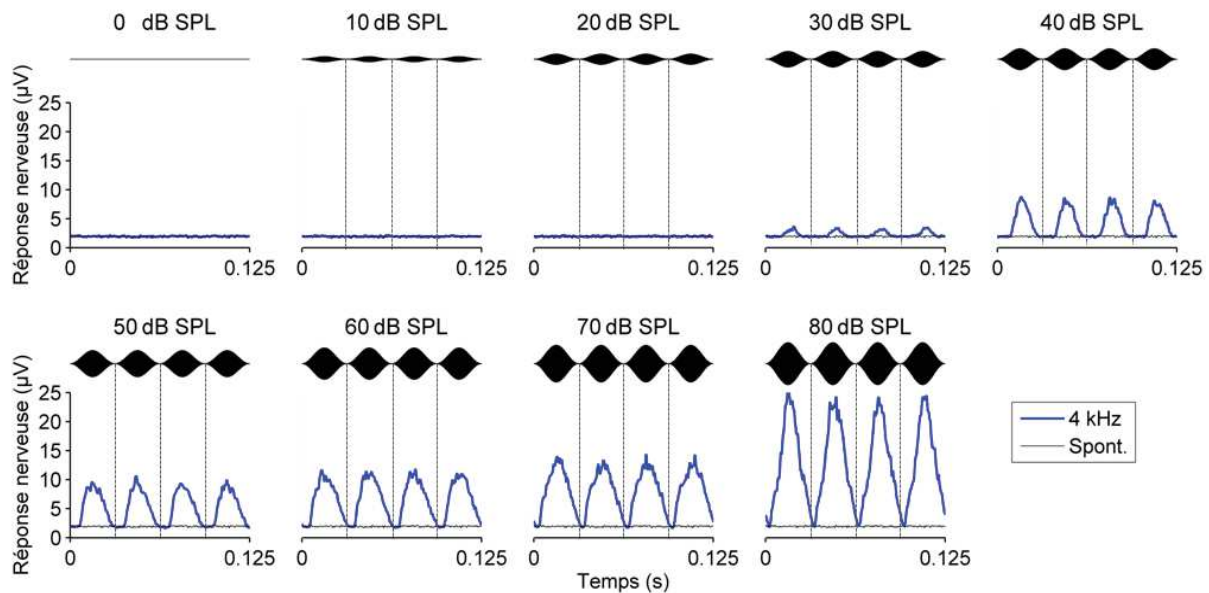


**Figure 4.6 : Origine nerveuse de la réponse enregistrée au contact de la cochlée.** **A.** Enveloppe du stimulus sonore : bande de bruit 1/3 d'octave centrée sur 4 kHz modulée en amplitude à une fréquence de modulation de 32 Hz et une profondeur de modulation de 100% pour différentes intensités sonores allant de 0 à 60 dB SPL par pas de 20 dB. **B, F.** Densité spectrale de puissance en l'absence de stimulation sonore avant (**B**) et après perfusion de TTX (3  $\mu$ M pendant 20 min) (**F**). La réponse du nerf à la stimulation est montrée avant (traces noires, **B** à **E**) et après (traces rouges, **F** à **I**) perfusion de TTX. La trace de couleur pale (trace grise pour l'avant : **B** à **E**), trace rose pour l'après : **F** à **I**) représente l'activité spontanée mesurée en absence de stimulation sonore.

### 4.2.3 Effet du niveau de stimulation

Pour évaluer l'effet du niveau de stimulation sur la forme de la réponse neuronale, nous avons considéré une bande de bruit 1/3 d'octave centrée sur le 4 kHz, modulée en amplitude à 32 Hz (période de modulation = 31,25 ms) pour une profondeur de modulation de 100%. La **figure 4.7** montre un exemple représentatif de réponse nerveuse pour un niveau de stimulation variant de 0 à 80 dB SPL par pas de 10 dB. Entre 0 et 20 dB SPL, la réponse neuronale est insensible à la modulation et confondue avec l'activité basale en gris dans la **figure 4.7**. Cette activité basale reflète probablement l'activité spontanée des fibres du nerf auditif. À 30 dB SPL, une modulation d'enveloppe devient observable dans la réponse avec toutefois un retour à l'activité basale de plusieurs millisecondes ( $\sim 15$  ms) entre deux cycles consécutifs. Plus le niveau sonore augmente, plus l'amplitude de la réponse nerveuse augmente. Entre 50 et 60 dB SPL, la réponse est asymétrique avec un temps de montée plus court

que le temps de descente ce qui pourrait s'expliquer par les propriétés d'activation rapide et d'adaptation des fibres du nerf auditif (Joris and Yin, 1992). À 80 dB SPL, la forme de la réponse devient triangulaire et l'amplitude double en raison, probablement, d'un recrutement massif des fibres qui innervent la base de la cochlée.

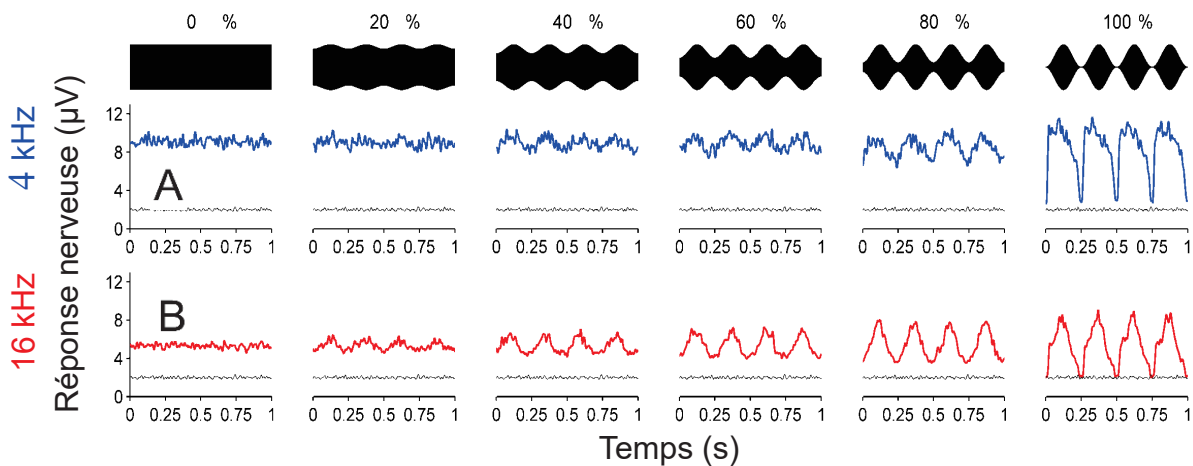


**Figure 4.7 : Réponse nerveuse pour différents niveaux de stimulation.** En haut de chaque graphique, une représentation de l'enveloppe du stimulus sonore : bande de bruit 1/3 d'octave centrée sur 4 kHz modulée en amplitude à une fréquence de modulation de 32 Hz et une profondeur de modulation de 100% pour différentes intensités sonores allant de 0 à 80 dB SPL par pas de 10 dB. En bleu, la réponse du nerf à la stimulation correspondante. La trace grise représente l'activité basale mesurée en absence de stimulation sonore.

#### 4.2.4. Effet de la profondeur de modulation

L'effet de la profondeur de modulation a été examiné en la faisant varier de 0 à 100% par pas de 20% (**figure 4.8**). Pour PM = 0%, la réponse est constante que ce soit à 4 kHz (trace bleu) ou 16 kHz (trace rouge). La modulation d'enveloppe devient observable dans la réponse à partir de 20% mais uniquement à 16 kHz. Pour PM = 80%, l'activité du nerf suit plus fidèlement l'enveloppe temporelle à 16 kHz qu'à 4 kHz. Pour une profondeur de modulation de 100%, la réponse devient asymétrique, surtout à 4 kHz, avec une activation rapide en début de cycle et une redescente plus lente en fin de cycle.



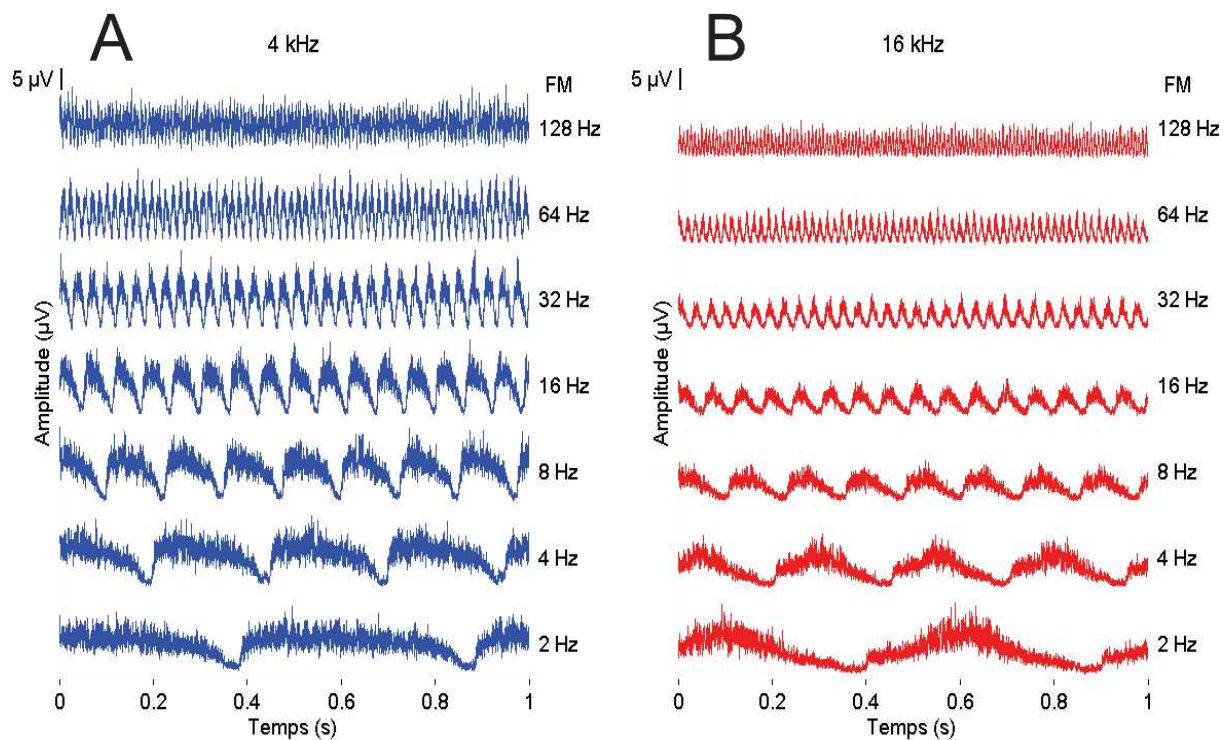


**Figure 4.8 : Réponse du nerf auditif pour différentes PM pour une stimulation de l'apex (4 kHz, bleu) et de la base (16 kHz, rouge).** En haut, en noir, la représentation du stimulus sonore : bande de bruit centrée sur 4 kHz (bleu, **A**) ou 16 kHz (rouge, **B**) modulée en amplitude avec FM = 4 Hz et à différentes PM allant de 0 à 100%. Le niveau de stimulation était de 60 dB SPL crête. En gris, sur chaque graphique, l'activité spontanée du nerf auditif (~ 2 µV).

#### 4.2.5. Effet de la fréquence de modulation (FM)

Pour évaluer l'effet de FM (**Figure 4.9**), nous avons considéré une bande de bruit centrée sur 4 kHz (tracés bleus) ou 16 kHz (tracés rouges) présentée à 60 dB SPL crête, pour PM = 100% et FM allant de 2 à 128 Hz. La réponse nerveuse suit la modulation d'enveloppe quelle que soit FM aussi bien à 4 kHz qu'à 16 kHz. En revanche, la forme de la réponse est clairement différente suivant que la portion de cochlée testée correspond au 4 kHz ou 16 kHz. À 4 kHz et pour FM < 32 Hz, la réponse croît très rapidement en début de cycle pour atteindre son amplitude maximale puis l'amplitude de la réponse diminue progressivement jusqu'à rejoindre l'activité spontanée du nerf auditif en fin de cycle. À 16 kHz, l'activité du nerf semble mieux suivre la modulation d'enveloppe notamment pour FM = 2, 4 et 8 Hz. Pour FM > 32 Hz que ce soit à 4 ou 16 kHz, la réponse semble suivre l'enveloppe temporelle de manière quasi sinusoïdale, ceci étant dû à la cadence élevée du cycle de modulation) qui devient probablement supérieure à la constante de temps de récupération post-stimulation des fibres du nerf auditif.

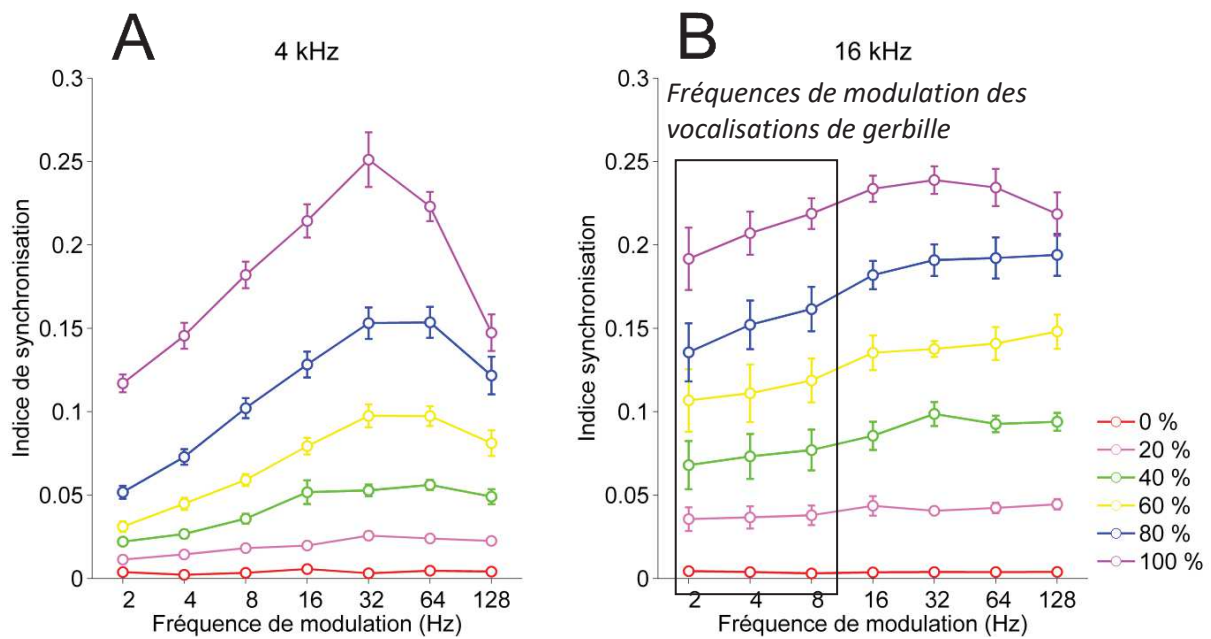




**Figure 4.9 : Réponses nerveuses pour différentes fréquences de modulation.** Les bandes de bruit étaient centrées sur 4 kHz (traces bleues, **A**) ou 16 kHz (traces rouges, **B**) et modulées en amplitude à 100% pour des fréquences de modulation comprise entre de 2 à 128 Hz (voir chiffre indiqué dans la marge).

#### 4.2.6. Indice de synchronisation

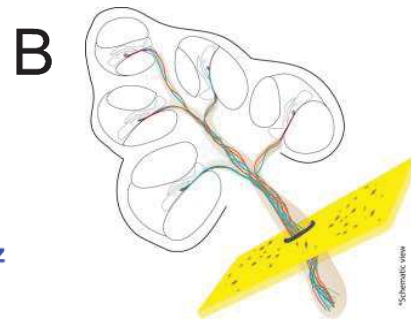
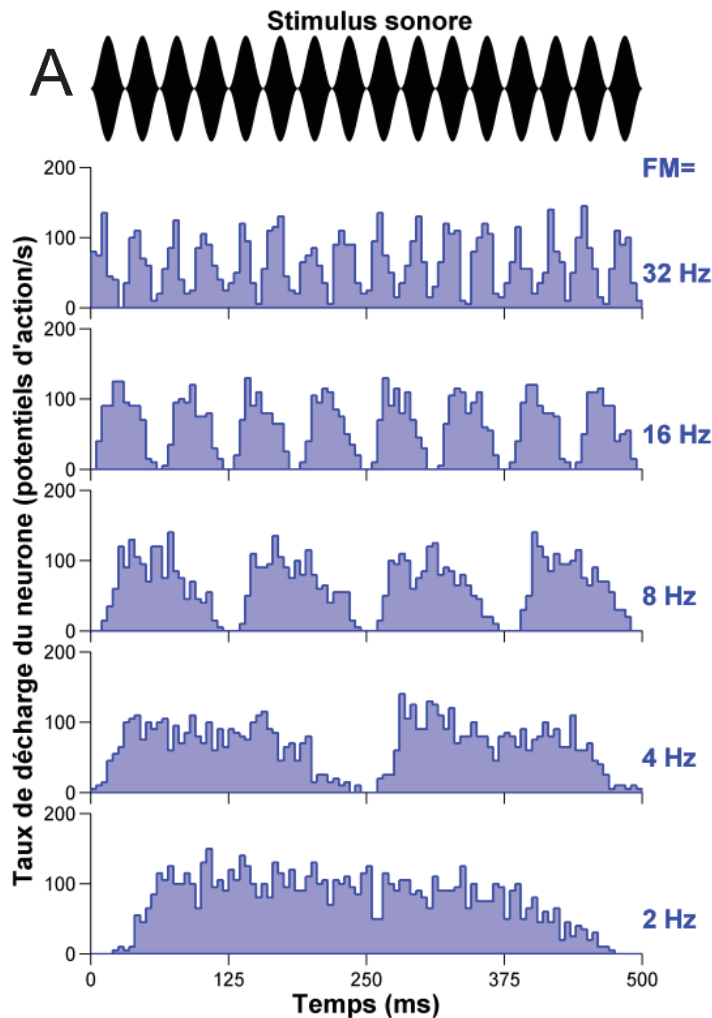
Pour mesurer le degré de synchronisation de la réponse nerveuse par rapport à l'enveloppe temporelle du signal de stimulation, nous avons calculé un indice de synchronisation basé sur une analyse spectrale de la réponse (Eggermont, 2002). Cet indice est compris entre 0 et 1 ; plus sa valeur augmente, plus la synchronisation est forte. Nous avons ensuite affiché la valeur de l'indice de synchronisation à 4 et 16 kHz, pour PM allant de 0 à 100% et FM allant de 2 à 128 Hz (**Figure 4.10**). Bien que la réponse à 16 kHz soit moins ample qu'à 4 kHz, la synchronisation est plus forte surtout pour FM = 2, 4, 8 Hz (voir le cadre noir dans la **Figure 4.10**), c'est-à-dire les fréquences de modulation des vocalisations de gerbille (Ter-Mikaelian et al., 2013).



**Figure 4.10 : Effet de la fréquence et de la profondeur de modulation sur l'indice de synchronisation.** Stimulus sonore : FP = 4 kHz (A) et 16 kHz (B), niveau = 60 dB SPL, modulé en amplitude à PM allant de 0 à 100% par pas de 20 %. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (n=7).

#### 4.2.7 Comparaison avec des enregistrements unitaires

Pour aller plus loin, nous avons réalisé quelques enregistrements de fibres dans le nerf auditif de gerbille en réponse à des bandes de bruit modulées en amplitude. La **figure 4.11** montre un exemple représentatif pour une même fibre de fréquence caractéristique égale à 1498 Hz et des fréquences de modulation variant de 2 Hz à 32 Hz. Dans cet exemple la fréquence porteuse était centrée sur la fréquence caractéristique de la fibre. A 2 Hz, la fibre répond pendant 400 ms et reste silencieux pendant 100 ms probablement car est en période de récupération post-stimulation. Le PSTH est caractérisé par un temps de montée (~30 ms) plus rapide que son temps de descente (60 ms). Lorsque la fréquence de modulation augmente, la forme du PSTH devient de plus en plus sinusoïdale expliquant ainsi pourquoi l'indice de synchronisation observé dans la figure précédente (**Figure 4.11**) est maximal pour une fréquence de modulation de 16 Hz. Au-dessus de 16 Hz (fréquence qui n'est pas montrée dans la **figure 4.11**), la fréquence de modulation devient grande par rapport à la période de récupération post-stimulation des fibres du nerf auditif qui est de l'ordre de 50 ms (Harris and Dallos, 1979). Cet effet pourrait expliquer pourquoi l'indice de synchronisation du nerf diminue au-delà à 16 Hz.



**Figure 4.11 : Réponse unitaire d'une fibre du nerf auditif à un signal modulé en amplitude. A.** Les mesures sont acquises à l'aide d'une micropipette placée dans le nerf auditif de gerbille. Le stimulus est ici une bande de bruit 1/3 d'octave, présentée à 74 dB SPL, centrée sur la fréquence caractéristique de la fibre (1498 Hz) modulée en amplitude à la fréquence de modulation FM avec une profondeur de modulation (PM) de 100%. Le stimulus sonore est en noir et le taux de décharge de la fibre en bleu. Cette expérience a été réalisée par Antoine Huet, un autre doctorant du laboratoire. **B.** Vue schématique de la cochlée.

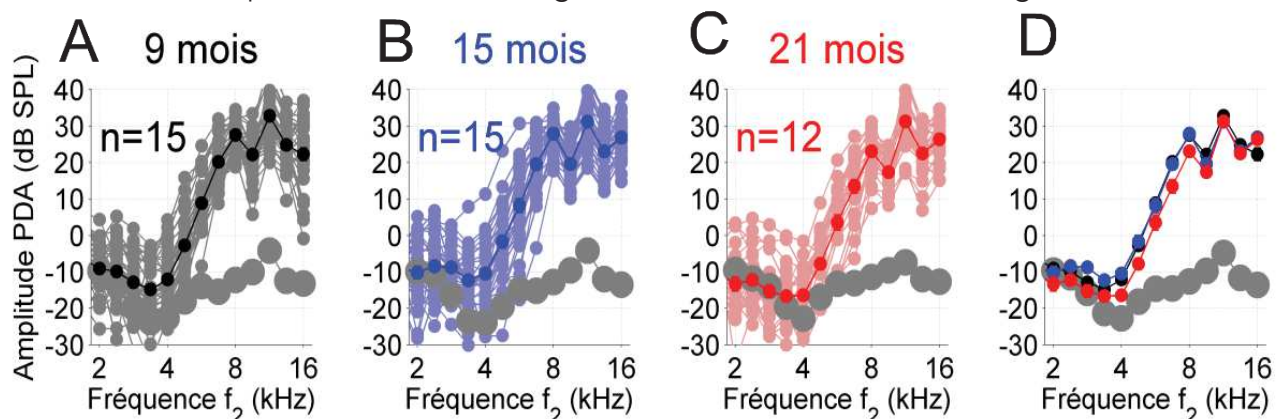
### 4.3. Réponse du nerf auditif au cours du vieillissement

Dans cette partie du travail, nous avons exploré l'audition du rat de souche Sprague-Dawley au cours du vieillissement. Les animaux étaient des femelles. Nous avons considéré 3 classes d'âges à savoir 9 mois ( $n = 15$ ), 15 mois ( $n = 15$ ) et 21 mois ( $n = 12$ ) qui correspondent respectivement à 35, 58 et 81 % de sa durée de vie (Keithley and Feldman, 1982). Les animaux dans les 3 groupes n'étaient pas les mêmes car les cochlées et les cerveaux étaient systématiquement prélevées en fin d'expérience pour des études immunohistochimique complémentaires (projet de collaboration avec le CNPS d'Orsay. Pour chaque groupe d'âge, nous avons caractérisé fonctionnellement l'audition périphérique des animaux avec des approches non-

invasives (produits de distorsion acoustique et potentiels évoqués auditifs précoces) et invasives (potentiels cochléaires). Parmi les approches invasives, nous avons mesuré le potentiel d'action composite (PAC) du nerf auditif et la réponse du nerf auditif à des modulations d'enveloppe temporelle.

#### 4.3.1. Produits de distorsion acoustique

L'amplitude des produits de distorsion acoustique (PDA) a été mesurée en réponse à deux sons purs de fréquences  $f_1$  et  $f_2$  ( $f_2=1,2\times f_1$ ), en faisant varier  $f_2$  de 2 à 20 kHz à raison de 4 fréquences testées par octave. L'amplitude de la distorsion mesurée à  $2f_1-f_2$  permet d'évaluer l'intégrité fonctionnelle des cellules ciliées externes. La figure 4.12 montre l'amplitude des PDA chez les animaux âgés de 9 (Figure 4.12.A,  $n=15$ ), 15 (Figure 4.12.B,  $n=15$ ) et 21 mois (Figure 4.12.C,  $n=12$ ). La superposition des résultats obtenus pour ces 3 classes d'âge ne met en évidence d'effet âge sur les PDA.



**Figure 4.12 : Effet du vieillissement sur l'amplitude des produits de distorsion acoustiques  $2f_1-f_2$ .** L'amplitude du produit de distorsion acoustique (PDA) est représentée en fonction de la fréquence  $f_2$  pour un niveau de présentation de 65 dB SPL pour  $f_2$ . Les résultats obtenus chez les animaux de 9, 15, et 21 mois sont présentés respectivement dans les panels **A**, **B** et **C**. La superposition des courbes pour les 3 âges est donnée dans le panel **D**. La ligne grise épaisse représente le niveau de bruit de fond. Les courbes de couleur pale représentent les données individuelles, les courbes de couleur vive la moyenne.

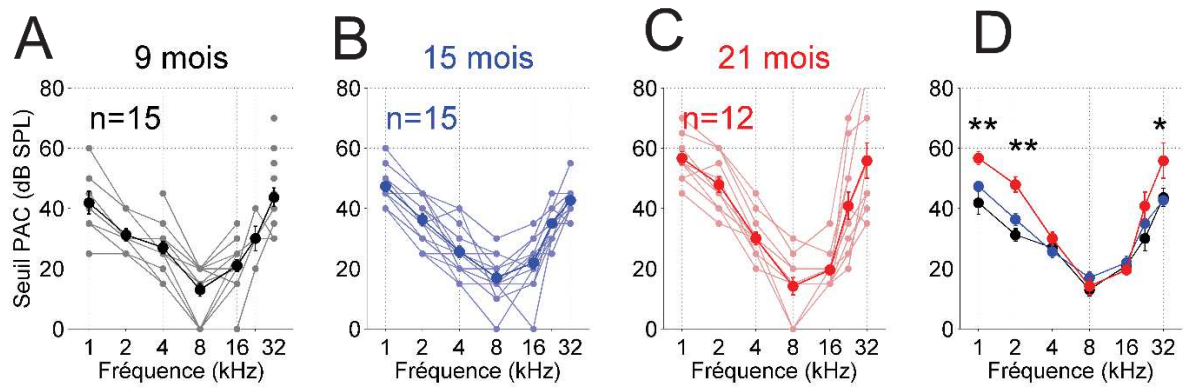
#### 4.3.2. Potentiels d'action composites du nerf auditif

Après avoir évalué l'intégrité fonctionnelle des cellules ciliées externes, nous avons mesuré l'amplitude du potentiel d'action composite (PAC) du nerf auditif qui

reflète l'activation synchrone des fibres du nerf auditif en début de stimulation. Dans nos expériences, l'enregistrement du potentiel d'action composite du nerf auditif était réalisé grâce à une électrode de platine apposée sur la membrane de la fenêtre ronde. Deux paramètres ont été pris en compte pour mesurer l'activité nerveuse induite par une stimulation sonore : 1) le seuil d'apparition du PAC qui est un bon indicateur du seuil auditif, et 2) l'amplitude du PAC en fonction de l'intensité de stimulation comme indicateur du nombre de fibres dans le nerf auditif.

#### 4.3.2.1. *Seuil auditifs*

Les seuils auditifs ont été obtenus en réponse à des bouffées tonales centrées sur des fréquences variant de 1 à 32 kHz et présentées à la cadence de 11 bouffées tonales par seconde. Le critère de seuil était défini comme étant la valeur en dB SPL nécessaire pour évoquer la première réponse électrophysiologique mesurable (amplitude  $N_1-P_1 > 0,6 \mu V$ ). La **figure 4.13** montre l'audiogramme moyen obtenu pour chaque groupe d'âge. Le seuil le plus bas était systématiquement obtenu à 8 kHz et ne variait pas significativement entre les 3 groupes (9 mois : 13.0 dB SPL $\pm$  2.2, 15 mois : 17.0 dB SPL $\pm$  1.9, 21 mois : 14.2 dB SPL $\pm$  2.8). Une légère élévation des seuils était observée dans les basses (< 4 kHz) et hautes fréquences (> 16 kHz) entre le groupe 15 et 21 mois.

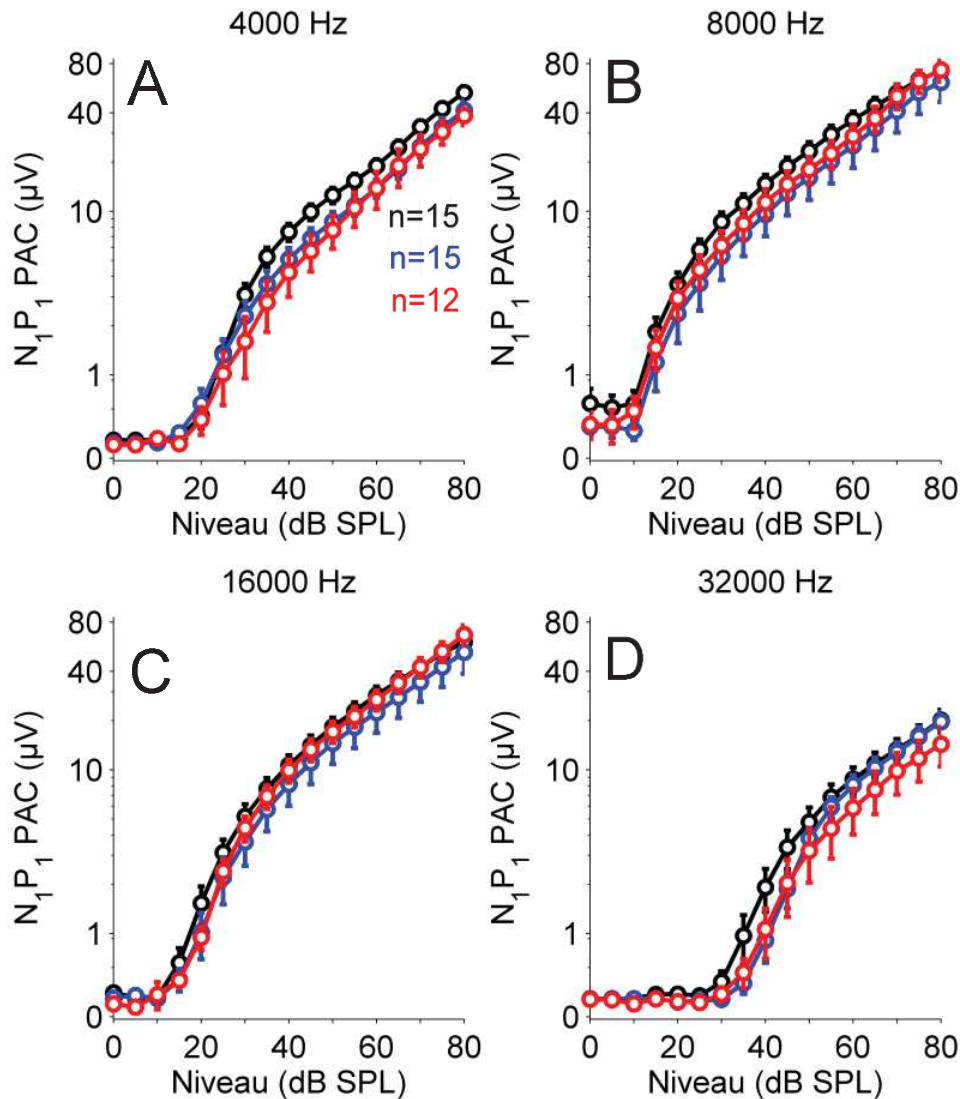


**Figure 4.13 : Effet du vieillissement sur les seuils auditifs relevés de 1 à 32 kHz à partir des potentiels d'action composites (PAC).** Le seuil est représenté en fonction de la fréquence de la bouffée tonale (1 ms de front de montée et de descente, 10 ms de durée, 11 bouffées/s). Les résultats obtenus chez les animaux de 9, 15, et 21 mois sont présentés respectivement dans les panels **A**, **B** et **C**. La valeur numérique représente les effectifs par groupe. Les courbes en trait fin représentent les données individuelles. **D**. La superposition des courbes pour les 3 âges. \*\* :  $p < 0,01$  ( $p\text{-value} = 2.27 \cdot 10^{-3}$ , Student unilatéral) pour 1kHz,  $p < 0,01$  ( $p\text{-value} = 1.86 \cdot 10^{-3}$ , Student unilatéral) pour 2kHz, \* :  $p < 0,05$  ( $p\text{-value} = 4.21 \cdot 10^{-2}$ , Student unilatéral) pour 32kHz.

#### 4.3.2.2. Amplitude du PAC en fonction de l'intensité de stimulation

Nous avons analysé l'amplitude  $N_1\text{-}P_1$  du PAC en fonction de l'intensité de stimulation pour des bouffées tonales centrées sur les fréquences 1, 2, 4, 8, 16, et 32 kHz (**Figure 4.14**). A 8 et 16 kHz, les courbes entrée-sortie observées pour les 3 groupes d'âge sont parfaitement superposables ce qui peut s'interpréter comme d'une absence d'effet du vieillissement dans cette zone cochléaire. Pour les autres fréquences ( $< 8$  kHz et  $> 16$  kHz), une différence significative est observée pour des niveaux de présentation supraliminaire.





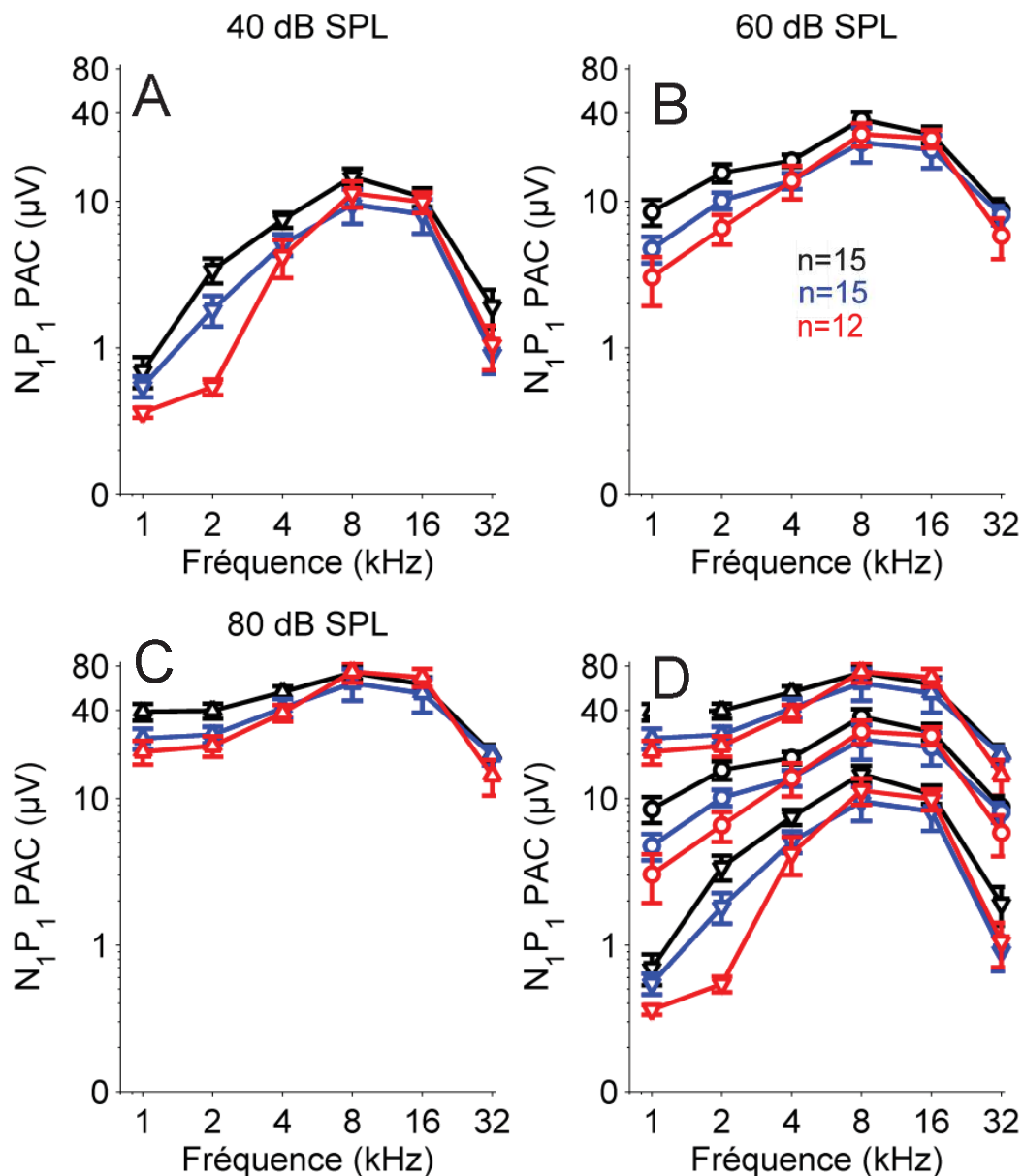
**Figure 4.14 : Effet du vieillissement sur l'amplitude du potentiel d'action composite.** Les bouffées tonales (1 ms de front de montée et de descente, 10 ms de durée, 11 bouffées/s, 500 présentations par niveau) étaient présentées à un niveau compris entre 0 et 80 dB SPL par pas de 5 dB. Les résultats obtenus à 4, 8, 16, et 32 kHz sont représentés dans les panels **A**, **B**, **C**, et **D**. Les 3 groupes d'âge sont représentés en noir (9m, n=15), bleu (15m, n=15) et rouge (21m, n=12). Les moyennes sont indiquées  $\pm 1$  fois l'erreur standard.

#### 4.3.2.3. Amplitude du PAC en fonction de la fréquence de stimulation

Pour mieux apprécier la perte d'amplitude du PAC le long de l'axe tonotopique, nous avons affiché l'amplitude  $N_1$ - $P_1$  du PAC en fonction de la



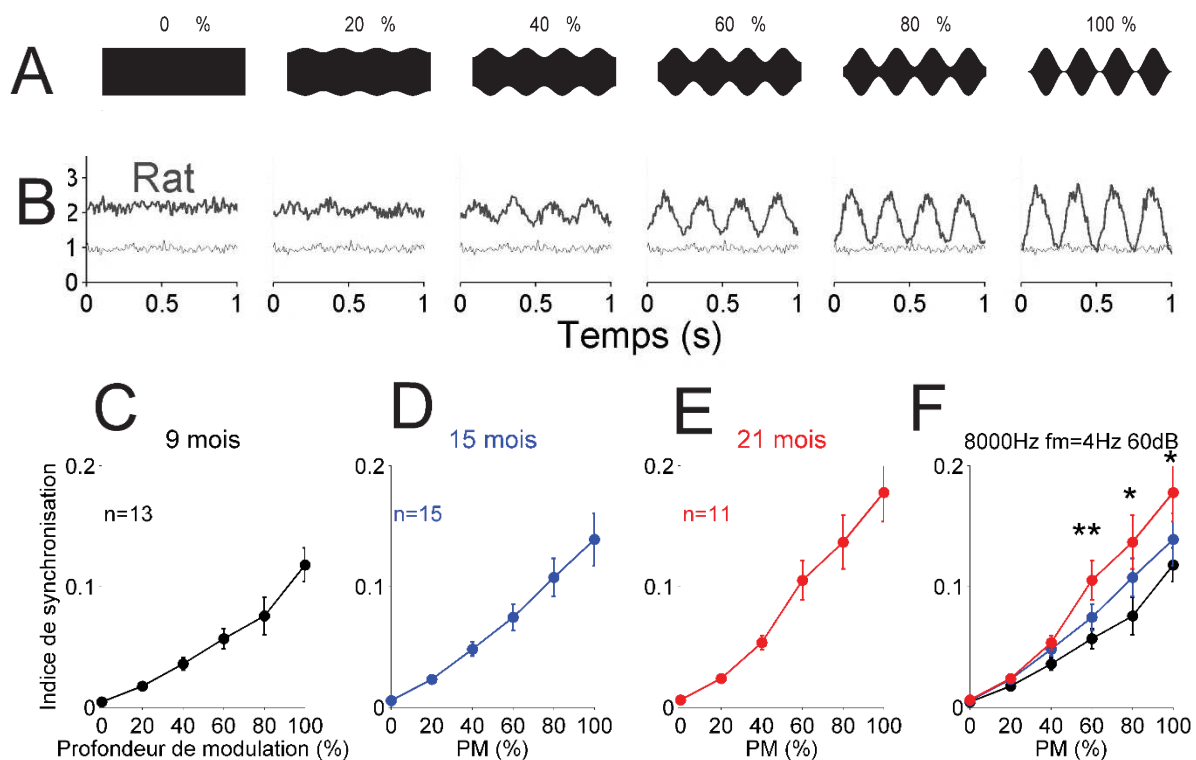
fréquence testée (**Figure 4.15**) pour un niveau de stimulation fixe. La superposition des courbes iso-niveau obtenues à 40, 60 et 80 dB SPL, montre très clairement un effet du vieillissement sur les fréquences extrêmes de l'audiogramme alors que les amplitudes observées à 8 et 16 kHz restent quasi inchangées en 9 et 21 mois.



**Figure 4.15 : Effet du vieillissement sur l'amplitude du potentiel d'action composite.** Les données présentées ici sont les mêmes que celles de la figure précédente. Nous avons simplement présenté ici l'amplitude du PAC en fonction de la fréquence testée à niveau constant : 40 (A), 60 (B), et 80 dB SPL (C). Dans le panel D, toutes les données ont été superposées.

### 4.3.3. Réponse à des sons modulés en amplitude

Nous avons ensuite mesuré l'activité du nerf auditif en réponse à des sons modulés en amplitude pour la fréquence porteuse de 8 kHz. Cette fréquence a été choisie car les seuils auditifs et les amplitudes  $N_1$ - $P_1$  demeurent inchangés à cette fréquence au cours du vieillissement pour nos 3 groupes de rats. Pour les 3 classes d'âge, la **figure 4.16** représente le degré de synchronisation de la réponse nerveuse en fonction de la profondeur de modulation, pour une fréquence de modulation d'enveloppe de 4 Hz. Chez les rats âgés de 21 mois, on observe une élévation significative de l'indice de synchronisation pour une profondeur de modulation supérieure à 60 %.

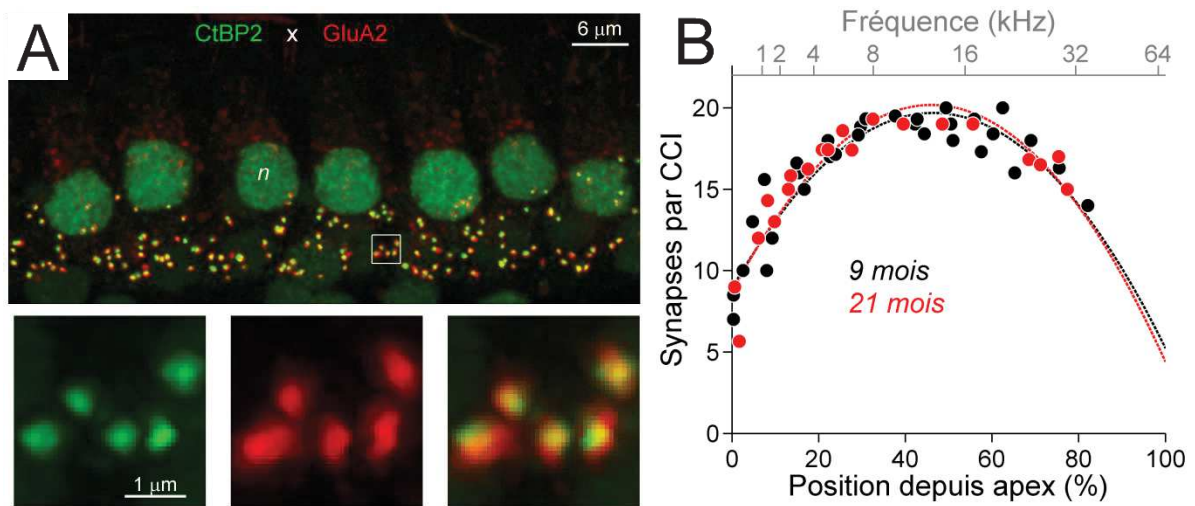


**Figure 4.16 : Effet du vieillissement sur l'indice de synchronisation de fibres du nerf auditif lorsque la profondeur de modulation varie de 0 à 100%. A.** Le stimulus sonore était des bandes de bruits centrées sur 8 kHz modulées sinusoïdalement en amplitude à FM = 4 Hz à 60 dB SPL de 0 à 100% par pas de 20%. **B.** Exemple de réponses du nerf auditif enregistré à la fenêtre ronde chez un rat du groupe 9 mois en réponse au stimulus présenté en **A**. Les résultats obtenus chez les animaux de 9, 15, et 21 mois sont présentés respectivement dans les panels **C**, **D** et **E**. La valeur numérique représente les effectifs par groupe. La superposition des courbes pour les 3 groupes d'âge est donnée dans le panel **F**. \*\*:  $p < 0,01$  ( $p$ -value =  $8.74 \cdot 10^{-3}$ , pour pm=60%, Student unilatéral),  $p < 0,05$  ( $p$ -value =  $1.85 \cdot 10^{-2}$ , Student unilatéral), \* :  $p < 0,05$  ( $p$ -value =  $2.35 \cdot 10^{-2}$ , Student unilatéral). Ces 3 différences sont statistiquement significatives entre les groupes 9 mois et 21 mois.

Deux *scenarii* pourraient expliquer ce résultat. Le premier serait lié à une perte de neurones entre 15 et 21 mois avec une perte sélective de neurones dont la réponse synchronisée à l'enveloppe temporelle est faible, à savoir les neurones à haute activité spontanée. Le second scénario serait un changement de phénotype des fibres du nerf auditif caractérisé par une diminution de l'activité spontanée de toutes les fibres sans perte de fibres. Les fibres ayant une AS moyenne plus basse que dans le groupe 9 mois, et donc une réponse mieux synchronisée avec l'enveloppe, produisent une réponse globale caractérisée par un meilleur indice de synchronisation. Pour évaluer ces 2 hypothèses, nous avons compté le nombre de synapses par CCI tout le long de la cochlée et mesuré l'activité spontanée globale du nerf auditif.

#### 4.3.4. Comptages de synapses

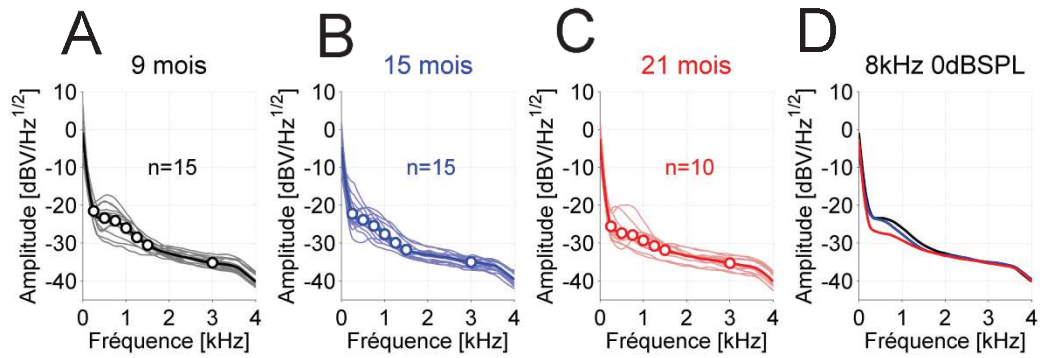
Pour évaluer le nombre de fibres dans le nerf auditif, nous avons prélevé 3 cochlées chez 3 animaux du groupes 9 mois, et 3 cochlées chez 3 animaux du groupe 21 mois pour faire des comptages de synapses. En utilisant la technique de l'immunohistochimie, le nombre de synapses à ruban a été estimé en détectant une juxtaposition du marquage du ruban et du marquage de la densité post-synaptique (**Figure 4.17A**). Chez les animaux 9 mois comme chez les animaux 21 mois, la distribution du nombre de synapses par CCI était unimodal (voir modèle d'ajustement polynomial d'ordre 2 dans la **figure 4.4**) avec un nombre important de synapses dans les régions cochléaires codant pour la zone du 8 au 16 kHz (**Figure 4.17B**, ~20 synapses/CCI) ce qui correspond avec la zone de meilleure sensibilité chez le rat et la zone où l'amplitude du PAC est la plus importante. Aucune différence n'a été trouvée entre les animaux des deux groupes suggérant ainsi que le nombre de fibres dans le nerf auditif n'a pas diminué au cours du vieillissement comme cela peut-être le cas chez d'autres mammifères comme la souris (Sergeyenko et al., 2013) et l'homme (Makary et al., 2011).



**Figure 4.17 : Comptages de synapses chez le groupe des rats 9 mois et celui des rats 21 mois. A.** Microscopie confocale CtBP2 (vert) et GluA2 (rouge) de la région encodant le 8 kHz chez les une cochlée du groupe 9 mois. Panneau du haut : vue agrandie de l'innervation de cellules ciliées internes (7 CCI; n indique le noyau des CCI). Panneaux du bas : projection en z du carré blanc montré au-dessus (4  $\mu\text{m}$   $\times$  4  $\mu\text{m}$ ), qui montre l'immunomarquage CtBP2 (panneau de gauche), ou GluA2 (panneau du centre), ou les deux (fusionné, panneau de droite). **B.** Nombre de synapses par CCI Le long de l'axe tonotopique chez les rats du groupe 9 mois (noir) et du groupe 21 mois (rouge). En noir, groupe 9 mois, 3 cochlées, 209 CCI, 2989 synapses ; rouge, groupe 21 mois, 3 cochlées ; 164 CCI, 2460 synapses). Chaque point représente la moyenne sur 6 à 7 CCI consécutives (Bourien et al., 2014). Les courbes pointillées représentent les modèles d'ajustement de type polynôme d'ordre 2 (groupe 9 mois, noir,  $f(x) = -0.005x^2 + 0.466x + 8.9$ ,  $r^2 > 0.9$  ; groupe 21 mois, rouge,  $f(x) = -0.0054x^2 + 0.5x + 8.7$ ,  $r^2 > 0.9$  avec x la position à partir de l'apex en pourcentage).

#### 4.3.5. Densité spectrale de puissance du bruit de fond cochléaire

La **figure 4.18A-C** montre la densité spectrale de puissance de l'activité spontanée du nerf auditif pour les 3 groupes d'âge. La superposition des courbes moyennes dans le panel D de la **figure 4.18** montre une diminution de l'activité spontanée globale du nerf auditif qui pourrait être due à une perte de fibre à haute activité spontanée ou à un changement de phénotype des fibres.



**Figure 4.18 : Effet du vieillissement sur le bruit de fond cochléaire.** La mesure de la densité spectrale de puissance spontanée obtenue chez les animaux de 9, 15, et 21 mois sont présentés respectivement dans les panels **A**, **B** et **C**. La superposition des courbes des bruits de fond pour les 3 groupes d'âge est donnée dans le panel **D**. La valeur numérique représente les effectifs par groupe.

Tous ensembles, ces résultats obtenus chez le rat Sprague-Dawley suggèrent que le vieillissement entraîne une modification du phénotype des fibres du nerf auditif sans pertes de fibres associées. Cette partie de mon travail va être prochainement soumis dans la revue eNeuro (Ocelli, Hasselmann et al, submitted in eNeuro).

## 5. Discussion

Les techniques d'exploration fonctionnelle de la cochlée utilisées en routine dans les laboratoires de recherche et en clinique (potentiels d'action composite du nerf auditif, potentiel évoqués auditifs précoces) utilisent des *stimuli* sonores brefs et stéréotypés (clics, bouffées tonales) pour tester l'intégrité fonctionnelle de la cochlée alors que celle-ci est plutôt conçue pour encoder des sons beaucoup plus complexes comme des signaux de paroles. Fort de ce constat, le but de cette étude a été d'élargir l'arsenal des tests existant en développant de nouveaux tests capables de mesurer la réponse du nerf auditif à des *stimuli* plus riches comme une bande de bruit modulée en amplitude. Ces techniques ont été développées et testées chez le rongeur et évaluées sur deux modèles physiopathologiques, à savoir une neuropathie auditive chez la gerbille et le vieillissement cochléaire chez le rat Sprague-Dawley.

### 5.1. Neuropathie auditive induite par application d'ouabaïne

L'ouabaïne est un glycoside cardiaque qui se lie spécifiquement à la pompe Na/K-ATPase et inhibe son activité (O'Brien et al., 1994). Cette pompe qui utilise l'énergie issue de la dégradation de l'ATP, permet d'échanger les ions sodium (Na<sup>+</sup>) issus du milieu intracellulaire avec les ions potassium (K<sup>+</sup>) issus du milieu extracellulaire contre leur gradient de concentration. Dans la cochlée, les pompes Na/K-ATPase sont exprimées sur les neurones de nerf auditif de type I au niveau du segment périphérique non-myélinisé (y compris le bouton synaptique) et dans la membrane du corps cellulaire (McLean et al., 2009). L'inhibition des pompes Na/K-ATPase entraîne un

excès d'ions sodium dans le milieu intracellulaire, le gonflement puis la mort cellulaire de la fibre.

Des études récentes menées à l'institut des Neurosciences de Montpellier ont montré que l'application d'une faible dose d'ouabaïne (33  $\mu\text{M}$ ) détruit préférentiellement les fibres à basse activité spontanée (Bourien et al., 2014). Ce résultat pourrait s'expliquer par des différences homéostatiques inter-fibres. Les fibres à haute activité spontanée qui ont un plus grand diamètre et plus de mitochondries que les fibres à basse activité spontanée. (Lieberman, 1980, 1982; Merchan-Perez and Lieberman, 1996) doivent avoir une plus grande densité de pompes Na/K-ATPase pour assurer leur cadence de décharge élevée. Dans ce cas, une dose faible d'ouabaïne n'affecte pas beaucoup ces fibres. En revanche, les fibres à basse-AS qui ont un diamètre plus fin et moins de mitochondries n'expriment pas autant de pompes Na/K-ATPase, ce qui leur confère probablement une plus grande vulnérabilité à l'ouabaïne.

Ce modèle de neuropathie est intéressant sur le plan expérimental car il permet de créer une perte sélective des fibres à basse activité spontanée comme observée au cours du vieillissement chez la gerbille (Schmiedt et al., 1996) et la souris (Sergeyenko et al., 2013) ou après une surexposition sonore entraînant une élévation temporaire des seuils auditifs (souris : Kujawa and Liberman, 2009 ; cochon d'indes : Lin et al., 2011; Furman et al., 2013). Par ailleurs, ces fibres jouent probablement un rôle important dans l'encodage de sons dans le bruit (Costalupes et al., 1984; Huet et al., 2016) et l'encodage de l'enveloppe temporelle (Joris and Yin, 1992).

Dans la première partie des résultats, nous avons montré que l'enregistrement du bruit de fond cochléaire en réponse à des bandes de bruit pulsées permet de détecter une perte de fibres à basse activité spontanée indétectable avec la technique du potentiel d'action composite (Batreil et al., 2017). Notre hypothèse



actuelle est que le potentiel d'action composite mesure le degré de synchronisation du premier potentiel d'action déclenché par les fibres en début de stimulation acoustique tandis que le gain neural dépend de la réponse soutenue des fibres. Chez la gerbille, le degré de synchronisation des fibres (c'est-à-dire la variance de la latence du premier potentiel d'action) est positivement corrélé avec l'activité spontanée de la fibre (Rhode and Smith, 1985; Oliver et al., 2006; Buran et al., 2010; Bourien et al., 2014; Huet et al., 2016). C'est la raison pour laquelle, les fibres à basse-AS ( $AS < 0.5$  PA/sec) contribuent peu au PAC, et leur perte est indétectable en mesurant l'amplitude du PAC.

En conclusion, nos données soutiennent l'idée que l'utilisation de méthodes électrophysiologiques basées sur la synchronisation du premier PA ne permet pas de détecter la perte de fibres à basse-activité spontanée. Ici nous proposons que les potentiels globaux à la fenêtre ronde, qui évaluent le taux de décharge soutenu du nerf (steady-state) constituent une voie plus prometteuse pour explorer l'intégrité du nerf auditif notamment chez l'homme en utilisant des enregistrements trans-tympaniques par exemple (Eggermont, 1976).

## 5.2. Vieillesse chez le rat Sprague Dawley

Le rat sprague-Dawley est un rat non-consanguin albinos, de croissance rapide, docile et facile à manipuler. Par ailleurs, cette souche répond bien aux tests comportementaux et électrophysiologiques constituant ainsi un modèle de choix pour évaluer l'effet de l'âge sur l'audition. Contrairement aux observations faites chez d'autres modèles animaux (Souris, Sergeyenko et al., 2013 ; Gerbille, Schmiedt et al., 1996) et chez l'homme (Makary et al., 2011), nos résultats montrent que le nombre de synapses et par conséquent le nombre de fibres du nerf auditif des rats Sprague-Dawley ne diminue pas au cours du vieillissement. A 21 mois, ce qui correspond à 85%

de la durée de vie d'un rat (Keithley and Feldman, 1982), le nombre de synapses par cellule ciliée interne est parfaitement conservé. En accord avec ces résultats, l'exploration fonctionnelle de ces rats âgés montre des seuils auditifs normaux et des amplitudes du PAC comparables aux rats jeunes. En revanche, l'activité spontanée globale du nerf auditif diminue chez les individus âgés. Ce résultat suggère une diminution de l'activité de l'ensemble des fibres du nerf auditif ou bien d'un contingent limité de fibres. Dans l'hypothèse d'une préservation des fibres à haute activité spontanée et d'une altération limitée aux fibres dont l'activité spontanée est moyenne, les seuils auditifs ainsi que l'amplitude du PAC seraient conservés (Bourien et al., 2014). De plus, l'augmentation du contingent de fibres à basse activité spontanée au cours du vieillissement pourrait aisément rendre compte de l'amélioration de la réponse à l'enveloppe temporelle, c'est-à-dire l'augmentation de l'indice de synchronisation du nerf avec l'enveloppe. En effet, les travaux de Joris and Yin (1992) et Cooper et al. (1993) ont montré que la réponse de fibres à basse activité spontanée était mieux synchronisée avec l'enveloppe du stimulus que le contingent des fibres à haute activité spontanée. Ces dernières ayant une réponse « on » plus importante sur le front montant de l'enveloppe ce qui dégrade ainsi l'indice de synchronisation. Des enregistrements unitaires chez de rats de 9 et 21 mois permettraient aussi d'évaluer la perte d'activité spontanée des fibres.

La diminution de l'activité spontanée des fibres du nerf auditif pourrait s'expliquer par 3 mécanismes distincts, à savoir, i) une origine présynaptique, ii) une altération strictement neuronale ou iii) un dysfonctionnement des fibres efférentes olivo-cochléaire.

L'activité des fibres du nerf auditif est gouvernée par la libération du glutamate par les cellules ciliées internes. Ces dernières possèdent à leur synapse un élément

dense aux électrons, appelé ruban synaptique, qui est entouré d'un halo de vésicules synaptiques (Nouvian et al., 2006). Un nombre faible de canaux calciques aux synapses à ruban entraînerait une fusion des vésicules à la membrane limitée et par conséquent serait à l'origine des fibres à basse activité spontanée. A l'inverse, une forte proportion de canaux calciques provoquerait une libération massive de glutamate et serait responsable d'un taux de décharge important chez les fibres à haute activité spontanée (Meyer et al., 2009). Au cours du vieillissement, une diminution du nombre de canaux calcique pourrait entraîner une diminution de l'exocytose et donc une réduction nette du taux de décharge des fibres du nerf auditif. Pour tester cette hypothèse, la mesure de l'activité des courants calciques des cellules ciliées avec la technique du patch-clamp est nécessaire.

Un deuxième scénario à l'origine de la réduction de l'activité spontanée pourrait être une altération directe des neurones auditifs. Une démyélinisation des fibres est peu probable. En effet, les fibres à haute activité spontanée étant fortement myélinisées, ce serait elles qui seraient en premières affectées et ce qui provoquerait une diminution de l'amplitude du PAC au cours du vieillissement, à l'inverse de nos résultats. En revanche, une altération du nombre de récepteurs post-synaptiques au glutamate et/ou des canaux sodiques sensibles au potentiel pourrait expliquer la réduction de l'activité spontanée. Ici, des expériences en patch-clamp et en immunohistochimie nous permettrait de tester cette hypothèse.

Enfin, une dernière hypothèse serait une altération des fibres efférentes olivo-cochléaires latérales. Ces dernières qui proviennent de l'olive supérieure latérale, projettent directement sur les fibres afférentes pour en réguler l'activité (Ruel et al., 2001, 2006). Cependant, une perte de fonction du faisceau olivo-cochléaire au cours du vieillissement est peu probable. En effet, la dopamine, principal neurotransmetteur

des efférences latérales, inhibe l'activité spontanée des fibres du nerf auditif. La perte des efférences latérales provoquerait donc une élévation du taux de décharge des fibres du nerf auditif (Ruel et al., 2001, 2006).

En raison des changements importants qui s'opèrent au cours du vieillissement, il est difficile d'identifier le mécanisme moléculaire à l'origine de l'effet observé, à savoir la réduction de l'activité spontanée des fibres du nerf auditif. Cependant, une perte de fonction du système métabolique comme cela est observé dans le système nerveux central (Du et al., 2015 ; Zhong et al., 2012) pourrait probablement réduire l'activité spontanée des fibres. Il a été démontré que l'activité spontanée d'une fibre est positivement corrélée avec sa densité de mitochondries (Merchan-Perez and Liberman, 1996). Il est bien connu qu'une fibre à haute activité spontanée a un cout métabolique élevé pour maintenir son taux de décharge. Une réduction du nombre de mitochondries avec l'âge aura pour effet de réduire l'activité de la fibre. Pour évaluer cette hypothèse, il serait intéressant d'observer des coupes de nerf au microscope électronique chez des rats de 21 mois pour mesurer la densité mitochondriale, puis de la comparer à celle de rats de 9 mois.

Par ailleurs, ce mécanisme pourrait aussi expliquer pourquoi les seuils auditifs s'élèvent de quelques dB dans les basses fréquences chez le groupe 21 mois. Dans cette zone fréquentielle, le nombre de fibres étant 2 à 3 fois plus faible que dans la zone du 8-16 kHz, une modification du phénotype des fibres peut impacter la sensibilité de neurones et donc impacter le seuil auditif. L'élévation des seuils auditifs dans les hautes fréquences pourrait être lié à un effet de l'âge sur les cellules ciliées externes que nous n'avons pas pu tester avec notre système de produits de distorsions acoustiques. Il serait donc intéressant de compter le nombre de CCE en microscopie électronique, dans le tour basal de la cochlée du groupe 21 mois.



## 6. Conclusion

Ce travail de thèse démontre qu'il est indispensable d'élargir le nombre de techniques d'exploration fonctionnelle de la cochlée. L'utilisation des produits de distorsion acoustiques associée à la mesure du potentiel d'action composite du nerf auditif ne permet pas de détecter des déficits subtils d'encodage dans le nerf auditif. Par exemple, la perte sélective des neurones à basse activité spontanée et à seuil d'activation haut, est indétectable avec les méthodes classiques alors que l'utilisation d'une mesure de l'activité soutenue des fibres le permet. Nos résultats montrent aussi qu'un changement de phénotype des fibres observé au cours du vieillissement du rat Sprague-Dawley, et caractérisé par une réduction de l'activité spontanée de fibres, est très difficile à détecter avec la mesure de l'amplitude du potentiel d'action composite du nerf auditif. L'utilisation d'un stimulus acoustique plus écologique comme une bande de bruit modulée en amplitude améliore la sensibilité diagnostique du test électrophysiologique. L'utilisation de ces nouvelles techniques en clinique, devrait permettre un meilleur diagnostic des « surdités cachées » et une meilleure prise en charge clinique et audioprothétique.

## 7. Références

Aran, J.M., Portmann, C., Delaunay, J., Pelerin, J., and Lenoir, J. (1969). [Electro-cochleograms: methods and initial results with children]. *Rev. Laryngol. - Otol. - Rhinol.* *90*, 615–634.

Backoff, P.M., Shaddock Palombi, P., and Caspary, D.M. (1999). Gamma-aminobutyric acidergic and glycinergic inputs shape coding of amplitude modulation in the chinchilla cochlear nucleus. *Hear. Res.* *134*, 77–88.

Baig, S.M., Koschak, A., Lieb, A., Gebhart, M., Dafinger, C., Nürnberg, G., Ali, A., Ahmad, I., Sinnegger-Brauns, M.J., Brandt, N., et al. (2011). Loss of Ca(v)1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat. Neurosci.* *14*, 77–84.

Bao, J., Lei, D., Du, Y., Ohlemiller, K.K., Beaudet, A.L., and Role, L.W. (2005). Requirement of nicotinic acetylcholine receptor subunit beta2 in the maintenance of spiral ganglion neurons during aging. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 3041–3045.

Barsz, K., Ison, J.R., Snell, K.B., and Walton, J.P. (2002). Behavioral and neural measures of auditory temporal acuity in aging humans and mice. *Neurobiol. Aging* *23*, 565–578.

Batrel, C., Huet, A., Hasselmann, F., Wang, J., Desmadryl, G., Nouvian, R., Puel, J.-L., and Bourien, J. (2017). Mass Potentials Recorded at the Round Window Enable the Detection of Low Spontaneous Rate Fibers in Gerbil Auditory Nerve. *PLoS One* *12*, e0169890.

von Békésy, G. (1956). SIMPLIFIED MODEL TO DEMONSTRATE THE ENERGY FLOW AND FORMATION OF TRAVELING WAVES SIMILAR TO THOSE FOUND IN THE COCHLEA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *42*, 930–944.

Benkafadar, N., Menardo, J., Bourien, J., Nouvian, R., François, F., Decaudin, D., Maiorano, D., Puel, J.-L., and Wang, J. (2017). Reversible p53 inhibition prevents cisplatin ototoxicity without blocking chemotherapeutic efficacy. *EMBO Mol. Med.* *9*, 7–26.

Benser, M.E., Marquis, R.E., and Hudspeth, A.J. (1996). Rapid, active hair bundle movements in hair cells from the bullfrog's sacculus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *16*, 5629–5643.

Betts, L.R., Sekuler, A.B., and Bennett, P.J. (2007). The effects of aging on orientation discrimination. *Vision Res.* *47*, 1769–1780.

Blanchet, C., Eróstegui, C., Sugawara, M., and Dulon, D. (1996). Acetylcholine-induced potassium current of guinea pig outer hair cells: its dependence on a calcium influx through nicotinic-like receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *16*, 2574–2584.

Bobbin, R.P., and Konishi, T. (1971). Acetylcholine mimics crossed olivocochlear bundle stimulation. *Nature. New Biol.* *231*, 222–223.

Bourien, J., Tang, Y., Batrel, C., Huet, A., Lenoir, M., Ladrech, S., Desmadryl, G., Nouvian, R., Puel, J.-L., and Wang, J. (2014). Contribution of auditory nerve fibers to compound action potential of the auditory nerve. *J. Neurophysiol.* *112*, 1025–1039.

Brandt, A., Striessnig, J., and Moser, T. (2003). CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 10832–10840.



- Brown, C.H. (1984). Directional hearing in aging rats. *Exp. Aging Res.* *10*, 35–38.
- Brownell, W.E., Bader, C.R., Bertrand, D., and de Ribaupierre, Y. (1985). Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* *227*, 194–196.
- Buran, B.N., Strenzke, N., Neef, A., Gundelfinger, E.D., Moser, T., and Liberman, M.C. (2010). Onset coding is degraded in auditory nerve fibers from mutant mice lacking synaptic ribbons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 7587–7597.
- Casimiro, M.C., Knollmann, B.C., Ebert, S.N., Vary, J.C., Greene, A.E., Franz, M.R., Grinberg, A., Huang, S.P., and 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.
- Caspary, D.M., Raza, A., Lawhorn Armour, B.A., Pippin, J., and Arnerić, S.P. (1990). Immunocytochemical and neurochemical evidence for age-related loss of GABA in the inferior colliculus: implications for neural presbycusis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *10*, 2363–2372.
- Caspary, D.M., Palombi, P.S., and Hughes, L.F. (2002). GABAergic inputs shape responses to amplitude modulated stimuli in the inferior colliculus. *Hear. Res.* *168*, 163–173.
- Caspary, D.M., Schatteman, T.A., and Hughes, L.F. (2005). Age-related changes in the inhibitory response properties of dorsal cochlear nucleus output neurons: role of inhibitory inputs. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 10952–10959.
- Cazals, Y., and Huang, Z.W. (1996). Average spectrum of cochlear activity: a possible synchronized firing, its olivo-cochlear feedback and alterations under anesthesia. *Hear. Res.* *101*, 81–92.
- Cazals, Y., Horner, K.C., and Huang, Z.W. (1998). Alterations in average spectrum of cochleoneural activity by long-term salicylate treatment in the guinea pig: a plausible index of tinnitus. *J. Neurophysiol.* *80*, 2113–2120.
- Cheatham, M.A., Huynh, K.H., Gao, J., Zuo, J., and Dallos, P. (2004). Cochlear function in Prestin knockout mice. *J. Physiol.* *560*, 821–830.
- Christensen, K., Frederiksen, H., and Hoffman, H.J. (2001). Genetic and environmental influences on self-reported reduced hearing in the old and oldest old. *J. Am. Geriatr. Soc.* *49*, 1512–1517.
- Ciorba, A., Hatzopoulos, S., Bianchini, C., Aimoni, C., Skarzynski, H., and Skarzynski, P.H. (2015). Genetics of presbycusis and presbystasis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* *28*, 29–35.
- Cone-Wesson, B., Dowell, R.C., Tomlin, D., Rance, G., and Ming, W.J. (2002). The auditory steady-state response: comparisons with the auditory brainstem response. *J. Am. Acad. Audiol.* *13*, 173-187; quiz 225-226.
- Cooper, J.C., and Gates, G.A. (1991). Hearing in the elderly--the Framingham cohort, 1983-1985: Part II. Prevalence of central auditory processing disorders. *Ear Hear.* *12*, 304–311.
- Cooper, N.P., Robertson, D., and Yates, G.K. (1993). Cochlear nerve fiber responses to amplitude-modulated stimuli: variations with spontaneous rate and other response characteristics. *J. Neurophysiol.* *70*, 370–386.
- Costalupes, J.A., Young, E.D., and Gibson, D.J. (1984). Effects of continuous noise backgrounds on rate response of auditory nerve fibers in cat. *J. Neurophysiol.* *51*, 1326–1344.

- Crawford, A.C., and Fettiplace, R. (1985). The mechanical properties of ciliary bundles of turtle cochlear hair cells. *J. Physiol.* *364*, 359–379.
- Cruickshanks, K.J., Wiley, T.L., Tweed, T.S., Klein, B.E., Klein, R., Mares-Perlman, J.A., and Nondahl, D.M. (1998). Prevalence of hearing loss in older adults in Beaver Dam, Wisconsin. The Epidemiology of Hearing Loss Study. *Am. J. Epidemiol.* *148*, 879–886.
- Dallos, P., and Harris, D. (1978). Properties of auditory nerve responses in absence of outer hair cells. *J. Neurophysiol.* *41*, 365–383.
- Dalton, D.S., Cruickshanks, K.J., Klein, R., Klein, B.E., and Wiley, T.L. (1998). Association of NIDDM and hearing loss. *Diabetes Care* *21*, 1540–1544.
- Dalton, D.S., Cruickshanks, K.J., Wiley, T.L., Klein, B.E., Klein, R., and Tweed, T.S. (2001). Association of leisure-time noise exposure and hearing loss. *Audiol. Off. Organ Int. Soc. Audiol.* *40*, 1–9.
- Darrow, K.N., Maison, S.F., and Liberman, M.C. (2006). Cochlear efferent feedback balances interaural sensitivity. *Nat. Neurosci.* *9*, 1474–1476.
- Darrow, K.N., Maison, S.F., and Liberman, M.C. (2007). Selective removal of lateral olivocochlear efferents increases vulnerability to acute acoustic injury. *J. Neurophysiol.* *97*, 1775–1785.
- Davis, R.I., Ahroon, W.A., and Hamernik, R.P. (1989). The relation among hearing loss, sensory cell loss and tuning characteristics in the chinchilla. *Hear. Res.* *41*, 1–14.
- Davis, R.R., Newlander, J.K., Ling, X., Cortopassi, G.A., Krieg, E.F., and Erway, L.C. (2001). Genetic basis for susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Hear. Res.* *155*, 82–90.
- Davis, R.R., Kozel, P., and Erway, L.C. (2003). Genetic influences in individual susceptibility to noise: a review. *Noise Health* *5*, 19–28.
- Delmaghani, S., Defourny, J., Aghaie, A., Beurg, M., Dulon, D., Thelen, N., Perfettini, I., Zelles, T., Aller, M., Meyer, A., et al. (2015). Hypervulnerability to Sound Exposure through Impaired Adaptive Proliferation of Peroxisomes. *Cell* *163*, 894–906.
- Delpire, E., Lu, J., England, R., Dull, C., and Thorne, T. (1999). Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat. Genet.* *22*, 192–195.
- Denk, W., and Webb, W.W. (1992). Forward and reverse transduction at the limit of sensitivity studied by correlating electrical and mechanical fluctuations in frog saccular hair cells. *Hear. Res.* *60*, 89–102.
- Dick, O., tom Dieck, S., Altmann, W.D., Ammermüller, J., Weiler, R., Garner, C.C., Gundelfinger, E.D., and Brandstätter, J.H. (2003). The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina. *Neuron* *37*, 775–786.
- Dixon, M.J., Gazzard, J., Chaudhry, S.S., Sampson, N., Schulte, B.A., and Steel, K.P. (1999). Mutation of the Na-K-Cl co-transporter gene *Slc12a2* results in deafness in mice. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 1579–1584.
- Dolan, D.F., Nuttall, A.L., and Avinash, G. (1990). Asynchronous neural activity recorded from the round window. *J. Acoust. Soc. Am.* *87*, 2621–2627.
- Dreyer, A., and Delgutte, B. (2006). Phase locking of auditory-nerve fibers to the envelopes of high-frequency sounds: implications for sound localization. *J. Neurophysiol.* *96*, 2327–2341.

Du, Z., Yang, Q., Liu, L., Li, S., Zhao, J., Hu, J., Liu, C., Qian, D., and Gao, C. (2015). NADPH oxidase 2-dependent oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in the ventral cochlear nucleus of D-galactose-induced aging rats. *Neuroscience* 286, 281–292.

Dubno, J.R., Dirks, D.D., and Morgan, D.E. (1984). Effects of age and mild hearing loss on speech recognition in noise. *J. Acoust. Soc. Am.* 76, 87–96.

Eggermont, J.J. (1976). Electrophysiological study of the normal and pathological human cochlea. II. Neural responses. *Rev. Laryngol. - Otol. - Rhinol.* 97 Suppl, 497–506.

Eggermont, J.J. (2002). Temporal modulation transfer functions in cat primary auditory cortex: separating stimulus effects from neural mechanisms. *J. Neurophysiol.* 87, 305–321.

Eisdorfer, C., and Wilkie, F. (1972). Auditory changes in the aged: a follow-up study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 20, 377–382.

Elgoyhen, A.B., Johnson, D.S., Boulter, J., Vetter, D.E., and Heinemann, S. (1994). Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79, 705–715.

Elgoyhen, A.B., Vetter, D.E., Katz, E., Rothlin, C.V., Heinemann, S.F., and Boulter, J. (2001). alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3501–3506.

ErosteGUI, C., Nenov, A.P., Norris, C.H., and Bobbin, R.P. (1994a). Acetylcholine activates a K<sup>+</sup> conductance permeable to Cs<sup>+</sup> in guinea pig outer hair cells. *Hear. Res.* 81, 119–129.

ErosteGUI, C., Norris, C.H., and Bobbin, R.P. (1994b). In vitro pharmacologic characterization of a cholinergic receptor on outer hair cells. *Hear. Res.* 74, 135–147.

Erway, L.C., Willott, J.F., Archer, J.R., and Harrison, D.E. (1993). Genetics of age-related hearing loss in mice: I. Inbred and F1 hybrid strains. *Hear. Res.* 65, 125–132.

Erway, L.C., Shiao, Y.W., Davis, R.R., and Krieg, E.F. (1996). Genetics of age-related hearing loss in mice. III. Susceptibility of inbred and F1 hybrid strains to noise-induced hearing loss. *Hear. Res.* 93, 181–187.

Evans, M.G. (1996). Acetylcholine activates two currents in guinea-pig outer hair cells. *J. Physiol.* 491 (Pt 2), 563–578.

Evans, E.F., and Klinke, R. (1982). The effects of intracochlear cyanide and tetrodotoxin on the properties of single cochlear nerve fibres in the cat. *J. Physiol.* 331, 385–408.

Eybalin, M. (1993). Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol. Rev.* 73, 309–373.

Fettiplace, R., and Hackney, C.M. (2006). The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 19–29.

Fitzgibbons, P.J., and Gordon-Salant, S. (1995). Age effects on duration discrimination with simple and complex stimuli. *J. Acoust. Soc. Am.* 98, 3140–3145.

Fitzgibbons, P.J., Gordon-Salant, S., and Friedman, S.A. (2006). Effects of age and sequence presentation rate on temporal order recognition. *J. Acoust. Soc. Am.* 120, 991–999.

- Flagella, M., Clarke, L.L., Miller, M.L., Erway, L.C., Giannella, R.A., Andringa, A., Gawenis, L.R., Kramer, J., Duffy, J.J., Doetschman, T., et al. (1999). Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf. *J. Biol. Chem.* *274*, 26946–26955.
- Florentine, M., Reed, C.M., Rabinowitz, W.M., Braida, L.D., Durlach, N.I., and Buus, S. (1993). Intensity perception. XIV. Intensity discrimination in listeners with sensorineural hearing loss. *J. Acoust. Soc. Am.* *94*, 2575–2586.
- Frank, T., Khimich, D., Neef, A., and Moser, T. (2009). Mechanisms contributing to synaptic Ca<sup>2+</sup> signals and their heterogeneity in hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 4483–4488.
- Frank, T., Rutherford, M.A., Strenzke, N., Neef, A., Pangršič, T., Khimich, D., Fejtova, A., Fetjova, A., Gundelfinger, E.D., Liberman, M.C., et al. (2010). Bassoon and the synaptic ribbon organize Ca<sup>2+</sup> channels and vesicles to add release sites and promote refilling. *Neuron* *68*, 724–738.
- Freyman, R.L., and Nelson, D.A. (1991). Frequency discrimination as a function of signal frequency and level in normal-hearing and hearing-impaired listeners. *J. Speech Hear. Res.* *34*, 1371–1386.
- Friedman, R.A., Adir, Y., Crenshaw, E.B., Ryan, A.F., and Rosenfeld, M.G. (2000). A transgenic insertional inner ear mutation on mouse chromosome 1. *The Laryngoscope* *110*, 489–496.
- Friedman, R.A., Van Laer, L., Huentelman, M.J., Sheth, S.S., Van Eyken, E., Corneveaux, J.J., Tembe, W.D., Halperin, R.F., Thorburn, A.Q., Thys, S., et al. (2009). GRM7 variants confer susceptibility to age-related hearing impairment. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 785–796.
- Frisina, D.R., and Frisina, R.D. (1997). Speech recognition in noise and presbycusis: relations to possible neural mechanisms. *Hear. Res.* *106*, 95–104.
- Froehlich, P., Collet, L., and Morgon, A. (1990). [Effect of attention on audition. Contribution of the study of the olivocochlear efferent system]. *Ann. Oto-Laryngol. Chir. Cervico Faciale Bull. Soc. Oto-Laryngol. Hopitaux Paris* *107*, 519–520.
- Fuchs, P.A., and Murrow, B.W. (1992). Cholinergic inhibition of short (outer) hair cells of the chick's cochlea. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *12*, 800–809.
- Furman, A.C., Kujawa, S.G., and Liberman, M.C. (2013). Noise-induced cochlear neuropathy is selective for fibers with low spontaneous rates. *J. Neurophysiol.* *110*, 577–586.
- Galas, S., Château, M.-T., Pomiès, P., Wang, J., Menardo, J., Puel, J.-L., Hugnot, J.-P., Verdier, J.-M., and Devau, G. (2012). [The diversity of aging models]. *Med. Sci. MS* *28*, 297–304.
- Gates, G.A. (1986). Research development in training programs. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* *112*, 821–822.
- Gates, G.A., and Cooper, J.C. (1991). Incidence of hearing decline in the elderly. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* *111*, 240–248.
- Gates, G.A., Cooper, J.C., Kannel, W.B., and Miller, N.J. (1990). Hearing in the elderly: the Framingham cohort, 1983-1985. Part I. Basic audiometric test results. *Ear Hear.* *11*, 247–256.
- Gates, G.A., Couropmitree, N.N., and Myers, R.H. (1999). Genetic associations in age-related hearing thresholds. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* *125*, 654–659.

- Gifford, R.H., Bacon, S.P., and Williams, E.J. (2007). An examination of speech recognition in a modulated background and of forward masking in younger and older listeners. *J. Speech Lang. Hear. Res. JSLHR* 50, 857–864.
- Glowatzki, E., and Fuchs, P.A. (2002). Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat. Neurosci.* 5, 147–154.
- Goldberg, J.M., and Brown, P.B. (1969). Response of binaural neurons of dog superior olivary complex to dichotic tonal stimuli: some physiological mechanisms of sound localization. *J. Neurophysiol.* 32, 613–636.
- Goossens, T., Vercammen, C., Wouters, J., and van Wieringen, A. (2016). Aging Affects Neural Synchronization to Speech-Related Acoustic Modulations. *Front. Aging Neurosci.* 8, 133.
- Gordon-Salant, S., and Fitzgibbons, P.J. (1993). Temporal factors and speech recognition performance in young and elderly listeners. *J. Speech Hear. Res.* 36, 1276–1285.
- Goutman, J.D., and Glowatzki, E. (2007). Time course and calcium dependence of transmitter release at a single ribbon synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16341–16346.
- Goycoolea, M.V., Goycoolea, H.G., Farfan, C.R., Rodriguez, L.G., Martinez, G.C., and Vidal, R. (1986). Effect of life in industrialized societies on hearing in natives of Easter Island. *The Laryngoscope* 96, 1391–1396.
- Grant, L., Yi, E., and Glowatzki, E. (2010). Two modes of release shape the postsynaptic response at the inner hair cell ribbon synapse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 4210–4220.
- Gratton, M.A., and Schulte, B.A. (1995). Alterations in microvasculature are associated with atrophy of the stria vascularis in quiet-aged gerbils. *Hear. Res.* 82, 44–52.
- Greene, C.C., McMillan, P.M., Barker, S.E., Kurnool, P., Lomax, M.I., Burmeister, M., and Lesperance, M.M. (2001). DFNA25, a novel locus for dominant nonsyndromic hereditary hearing impairment, maps to 12q21-24. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 254–260.
- Gregory, F.D., Bryan, K.E., Pangršič, T., Calin-Jageman, I.E., Moser, T., and Lee, A. (2011). Harmonin inhibits presynaptic Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in mouse inner hair cells. *Nat. Neurosci.* 14, 1109–1111.
- Guo, Y., Zhang, C., Du, X., Nair, U., and Yoo, T.-J. (2005). Morphological and functional alterations of the cochlea in apolipoprotein E gene deficient mice. *Hear. Res.* 208, 54–67.
- Harris, D.M., and Dallos, P. (1979). Forward masking of auditory nerve fiber responses. *J. Neurophysiol.* 42, 1083–1107.
- Hawkins, J.E. (1973). Comparative otopathology: aging, noise, and ototoxic drugs. *Adv. Otorhinolaryngol.* 20, 125–141.
- He, N., Dubno, J.R., and Mills, J.H. (1998). Frequency and intensity discrimination measured in a maximum-likelihood procedure from young and aged normal-hearing subjects. *J. Acoust. Soc. Am.* 103, 553–565.
- Heidrych, P., Zimmermann, U., Bress, A., Pusch, C.M., Ruth, P., Pfister, M., Knipper, M., and Blin, N. (2008). Rab8b GTPase, a protein transport regulator, is an interacting partner of otoferlin, defective in a human autosomal recessive deafness form. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3814–3821.

- Henry, K.R. (1982). Age-related auditory loss and genetics: an electrocochleographic comparison of six inbred strains of mice. *J. Gerontol.* *37*, 275–282.
- Hildebrand, M.S., de Silva, M.G., Klockars, T., Rose, E., Price, M., Smith, R.J.H., McGuirt, W.T., Christopoulos, H., Petit, C., and Dahl, H.-H.M. (2004). Characterisation of DRASIC in the mouse inner ear. *Hear. Res.* *190*, 149–160.
- Hinchcliffe, R. (1990). The age function of hearing--aspects of the epidemiology. *Acta Oto-Laryngol. Suppl.* *476*, 7–11.
- Holme, R.H., and Steel, K.P. (2004). Progressive hearing loss and increased susceptibility to noise-induced hearing loss in mice carrying a *Cdh23* but not a *Myo7a* mutation. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* *5*, 66–79.
- Holt, M., Cooke, A., Neef, A., and Lagnado, L. (2004). High mobility of vesicles supports continuous exocytosis at a ribbon synapse. *Curr. Biol. CB* *14*, 173–183.
- Hossain, W.A., Antic, S.D., Yang, Y., Rasband, M.N., and Morest, D.K. (2005). Where is the spike generator of the cochlear nerve? Voltage-gated sodium channels in the mouse cochlea. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 6857–6868.
- Housley, G.D., and Ashmore, J.F. (1991). Direct measurement of the action of acetylcholine on isolated outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Proc. Biol. Sci.* *244*, 161–167.
- Howard, J., and Hudspeth, A.J. (1987). Mechanical relaxation of the hair bundle mediates adaptation in mechano-electrical transduction by the bullfrog's saccular hair cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 3064–3068.
- Huang, G., and Santos-Sacchi, J. (1994). Motility voltage sensor of the outer hair cell resides within the lateral plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 12268–12272.
- Huet, A., Batrel, C., Tang, Y., Desmadryl, G., Wang, J., Puel, J.-L., and Bourien, J. (2016). Sound coding in the auditory nerve of gerbils. *Hear. Res.* *338*, 32–39.
- Issa, N.P., and Hudspeth, A.J. (1994). Clustering of Ca<sup>2+</sup> channels and Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels at fluorescently labeled presynaptic active zones of hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 7578–7582.
- Issa, N.P., and Hudspeth, A.J. (1996). The entry and clearance of Ca<sup>2+</sup> at individual presynaptic active zones of hair cells from the bullfrog's sacculus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 9527–9532.
- Jaramillo, F., and Wiesenfeld, K. (1998). Mechano-electrical transduction assisted by Brownian motion: a role for noise in the auditory system. *Nat. Neurosci.* *1*, 384–388.
- Johnson, K.R., and Zheng, Q.Y. (2002). *Ahl2*, a second locus affecting age-related hearing loss in mice. *Genomics* *80*, 461–464.
- Johnson, K.R., Erway, L.C., Cook, S.A., Willott, J.F., and Zheng, Q.Y. (1997). A major gene affecting age-related hearing loss in C57BL/6J mice. *Hear. Res.* *114*, 83–92.
- Johnson, K.R., Zheng, Q.Y., Bykhovskaya, Y., Spirina, O., and Fischel-Ghodsian, N. (2001). A nuclear-mitochondrial DNA interaction affecting hearing impairment in mice. *Nat. Genet.* *27*, 191–194.



- Johnson, S.L., Marcotti, W., and Kros, C.J. (2005). Increase in efficiency and reduction in Ca<sup>2+</sup> dependence of exocytosis during development of mouse inner hair cells. *J. Physiol.* *563*, 177–191.
- Johnson, S.L., Beurg, M., Marcotti, W., and Fettiplace, R. (2011). Prestin-driven cochlear amplification is not limited by the outer hair cell membrane time constant. *Neuron* *70*, 1143–1154.
- Joris, P.X., and Yin, T.C. (1992). Responses to amplitude-modulated tones in the auditory nerve of the cat. *J. Acoust. Soc. Am.* *91*, 215–232.
- Joris, P.X., Schreiner, C.E., and Rees, A. (2004). Neural processing of amplitude-modulated sounds. *Physiol. Rev.* *84*, 541–577.
- Kaplan, J., Gerber, S., Bonneau, D., Rozet, J.M., Delrieu, O., Briard, M.L., Dollfus, H., Ghazi, I., Dufier, J.L., and Frézal, J. (1992). A gene for Usher syndrome type I (USH1A) maps to chromosome 14q. *Genomics* *14*, 979–987.
- Katsuki, Y., Sumi, T., Uchiyama, H., and Watanabe, T. (1958). Electric responses of auditory neurons in cat to sound stimulation. *J. Neurophysiol.* *21*, 569–588.
- Katsuki, Y., Yanagisawa, K., and Kanzaki, J. (1966). Tetraethylammonium and tetrodotoxin: effects on cochlear potentials. *Science* *151*, 1544–1545.
- Kawase, T., and Liberman, M.C. (1992). Spatial organization of the auditory nerve according to spontaneous discharge rate. *J. Comp. Neurol.* *319*, 312–318.
- Keithley, E.M., and Feldman, M.L. (1982). Hair cell counts in an age-graded series of rat cochleas. *Hear. Res.* *8*, 249–262.
- Keithley, E.M., Canto, C., Zheng, Q.Y., Wang, X., Fischel-Ghodsian, N., and Johnson, K.R. (2005). Cu/Zn superoxide dismutase and age-related hearing loss. *Hear. Res.* *209*, 76–85.
- Khimich, D., Nouvian, R., Pujol, R., Tom Dieck, S., Egner, A., Gundelfinger, E.D., and Moser, T. (2005). Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature* *434*, 889–894.
- Kiang, N.Y., Rho, J.M., Northrop, C.C., Liberman, M.C., and Ryugo, D.K. (1982). Hair-cell innervation by spiral ganglion cells in adult cats. *Science* *217*, 175–177.
- Knirsch, M., Brandt, N., Braig, C., Kuhn, S., Hirt, B., Münkner, S., Knipper, M., and Engel, J. (2007). Persistence of Ca(v)1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in mature outer hair cells supports outer hair cell afferent signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 6442–6451.
- Koch, U., and Grothe, B. (1998). GABAergic and glycinergic inhibition sharpens tuning for frequency modulations in the inferior colliculus of the big brown bat. *J. Neurophysiol.* *80*, 71–82.
- Koehnke, J., and Besing, J.M. (1996). A procedure for testing speech intelligibility in a virtual listening environment. *Ear Hear.* *17*, 211–217.
- Konishi, T., and Mendelsohn, M. (1970). Effect of ouabain on cochlear potentials and endolymph composition in guinea pigs. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* *69*, 192–199.
- Konishi, T., and Salt, A.N. (1980). Permeability to potassium of the endolymph-perilymph barrier and its possible relation to hair cell function. *Exp. Brain Res.* *40*, 457–463.



- Kozlov, A.S., Risler, T., and Hudspeth, A.J. (2007). Coherent motion of stereocilia assures the concerted gating of hair-cell transduction channels. *Nat. Neurosci.* *10*, 87–92.
- Krishna, B.S., and Semple, M.N. (2000). Auditory temporal processing: responses to sinusoidally amplitude-modulated tones in the inferior colliculus. *J. Neurophysiol.* *84*, 255–273.
- Krull, V., Humes, L.E., and Kidd, G.R. (2013). Reconstructing wholes from parts: effects of modality, age, and hearing loss on word recognition. *Ear Hear.* *34*, e14-23.
- Kuijpers, W., Van der Vleuten, A.C., and Bonting, S.L. (1967). Cochlear function and sodium and potassium activated adenosine triphosphatase. *Science* *157*, 949–950.
- Kujawa, S.G., and Liberman, M.C. (2009). Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 14077–14085.
- Kujawa, S.G., Glatcke, T.J., Fallon, M., and Bobbin, R.P. (1993). Contralateral sound suppresses distortion product otoacoustic emissions through cholinergic mechanisms. *Hear. Res.* *68*, 97–106.
- Kujawa, S.G., Glatcke, T.J., Fallon, M., and Bobbin, R.P. (1994). A nicotinic-like receptor mediates suppression of distortion product otoacoustic emissions by contralateral sound. *Hear. Res.* *74*, 122–134.
- Kujoth, G.C., Hiona, A., Pugh, T.D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S.E., Hofer, T., Seo, A.Y., Sullivan, R., Jobling, W.A., et al. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* *309*, 481–484.
- Kuwada, S., Batra, R., and Maher, V.L. (1986). Scalp potentials of normal and hearing-impaired subjects in response to sinusoidally amplitude-modulated tones. *Hear. Res.* *21*, 179–192.
- Le Prell, C.G., Shore, S.E., Hughes, L.F., and Bledsoe, S.C. (2003). Disruption of lateral efferent pathways: functional changes in auditory evoked responses. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* *4*, 276–290.
- Lee, M.P., Ravenel, J.D., Hu, R.J., Lustig, L.R., Tomaselli, G., Berger, R.D., Brandenburg, S.A., Litzi, T.J., Bunton, T.E., Limb, C., et al. (2000). Targeted disruption of the *Kvlqt1* gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice. *J. Clin. Invest.* *106*, 1447–1455.
- Leigh-Paffenroth, E.D., and Fowler, C.G. (2006). Amplitude-modulated auditory steady-state responses in younger and older listeners. *J. Am. Acad. Audiol.* *17*, 582–597.
- Lenzi, D., Runyeon, J.W., Crum, J., Ellisman, M.H., and Roberts, W.M. (1999). Synaptic vesicle populations in saccular hair cells reconstructed by electron tomography. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 119–132.
- Lenzi, D., Crum, J., Ellisman, M.H., and Roberts, W.M. (2002). Depolarization redistributes synaptic membrane and creates a gradient of vesicles on the synaptic body at a ribbon synapse. *Neuron* *36*, 649–659.
- Letts, V.A., Valenzuela, A., Dunbar, C., Zheng, Q.Y., Johnson, K.R., and Frankel, W.N. (2000). A new spontaneous mouse mutation in the *Kcne1* gene. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* *11*, 831–835.
- Leventhal, A.G., Wang, Y., Pu, M., Zhou, Y., and Ma, Y. (2003). GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys. *Science* *300*, 812–815.

- Li, H.S., and Borg, E. (1991). Age-related loss of auditory sensitivity in two mouse genotypes. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 111, 827–834.
- Li, G.-L., Keen, E., Andor-Ardó, D., Hudspeth, A.J., and von Gersdorff, H. (2009). The unitary event underlying multiquantal EPSCs at a hair cell's ribbon synapse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 7558–7568.
- Lieberman, M.C. (1978). Auditory-nerve response from cats raised in a low-noise chamber. *J. Acoust. Soc. Am.* 63, 442–455.
- Lieberman, M.C. (1980). Morphological differences among radial afferent fibers in the cat cochlea: an electron-microscopic study of serial sections. *Hear. Res.* 3, 45–63.
- Lieberman, M.C. (1982). Single-neuron labeling in the cat auditory nerve. *Science* 216, 1239–1241.
- Lieberman, M.C. (1991). Central projections of auditory-nerve fibers of differing spontaneous rate. I. Anteroventral cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 313, 240–258.
- Lieberman, M.C., and Dodds, L.W. (1984). Single-neuron labeling and chronic cochlear pathology. III. Stereocilia damage and alterations of threshold tuning curves. *Hear. Res.* 16, 55–74.
- Lieberman, M.C., and Oliver, M.E. (1984). Morphometry of intracellularly labeled neurons of the auditory nerve: correlations with functional properties. *J. Comp. Neurol.* 223, 163–176.
- Lieberman, L.D., Wang, H., and Liberman, M.C. (2011). Opposing gradients of ribbon size and AMPA receptor expression underlie sensitivity differences among cochlear-nerve/hair-cell synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 801–808.
- Lieberman, M.C., Gao, J., He, D.Z.Z., Wu, X., Jia, S., and Zuo, J. (2002). Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature* 419, 300–304.
- Lin, H.W., Furman, A.C., Kujawa, S.G., and Liberman, M.C. (2011). Primary neural degeneration in the Guinea pig cochlea after reversible noise-induced threshold shift. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 12, 605–616.
- Lister, J.J., Koehnke, J.D., and Besing, J.M. (2000). Binaural gap duration discrimination in listeners with impaired hearing and normal hearing. *Ear Hear.* 21, 141–150.
- Liu, X.Z., Walsh, J., Mburu, P., Kendrick-Jones, J., Cope, M.J., Steel, K.P., and Brown, S.D. (1997). Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat. Genet.* 16, 188–190.
- Maison, S.F., Adams, J.C., and Liberman, M.C. (2003). Olivocochlear innervation in the mouse: immunocytochemical maps, crossed versus uncrossed contributions, and transmitter colocalization. *J. Comp. Neurol.* 455, 406–416.
- Makary, C.A., Shin, J., Kujawa, S.G., Liberman, M.C., and Merchant, S.N. (2011). Age-related primary cochlear neuronal degeneration in human temporal bones. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 12, 711–717.
- Marcus, D.C., Marcus, N.Y., and Thalmann, R. (1981). Changes in cation contents of stria vascularis with ouabain and potassium-free perfusion. *Hear. Res.* 4, 149–160.

- Martin, P., and Hudspeth, A.J. (1999). Active hair-bundle movements can amplify a hair cell's response to oscillatory mechanical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 14306–14311.
- Matsubara, A., Kawabata, Y., Takumi, Y., Usami, S., Shinkawa, H., Haruta, A., Matsuda, K., and Tono, T. (1998). Quantitative immunogold cytochemistry reveals sources of glutamate release in inner ear ischemia. *Acta Oto-Laryngol. Suppl.* *539*, 48–51.
- McLean, W.J., Smith, K.A., Glowatzki, E., and Pyott, S.J. (2009). Distribution of the Na,K-ATPase alpha subunit in the rat spiral ganglion and organ of corti. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* *10*, 37–49.
- Menardo, J., Tang, Y., Ladrech, S., Lenoir, M., Casas, F., Michel, C., Bourien, J., Ruel, J., Rebillard, G., Maurice, T., et al. (2012). Oxidative stress, inflammation, and autophagic stress as the key mechanisms of premature age-related hearing loss in SAMP8 mouse Cochlea. *Antioxid. Redox Signal.* *16*, 263–274.
- Mendelson, J.R., and Ricketts, C. (2001). Age-related temporal processing speed deterioration in auditory cortex. *Hear. Res.* *158*, 84–94.
- Merchan-Perez, A., and Liberman, M.C. (1996). Ultrastructural differences among afferent synapses on cochlear hair cells: correlations with spontaneous discharge rate. *J. Comp. Neurol.* *371*, 208–221.
- Meric, C., and Collet, L. (1992). Visual attention and evoked otoacoustic emissions: a slight but real effect. *Int. J. Psychophysiol. Off. J. Int. Organ. Psychophysiol.* *12*, 233–235.
- Meyer, A.C., Frank, T., Khimich, D., Hoch, G., Riedel, D., Chapochnikov, N.M., Yarin, Y.M., Harke, B., Hell, S.W., Egner, A., et al. (2009). Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. *Nat. Neurosci.* *12*, 444–453.
- Mills, J.H., Boettcher, F.A., and Dubno, J.R. (1997). Interaction of noise-induced permanent threshold shift and age-related threshold shift. *J. Acoust. Soc. Am.* *101*, 1681–1686.
- Moser, T., and Beutner, D. (2000). Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 883–888.
- Moynihan, L., Houseman, M., Newton, V., Mueller, R., and Lench, N. (1999). DFNB20: a novel locus for autosomal recessive, non-syndromal sensorineural hearing loss maps to chromosome 11q25-qter. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *7*, 243–246.
- Müller, M. (1996). The cochlear place-frequency map of the adult and developing Mongolian gerbil. *Hear. Res.* *94*, 148–156.
- Müller, M., and Robertson, D. (1991). Relationship between tone burst discharge pattern and spontaneous firing rate of auditory nerve fibres in the guinea pig. *Hear. Res.* *57*, 63–70.
- Neef, J., Gehrt, A., Bulankina, A.V., Meyer, A.C., Riedel, D., Gregg, R.G., Strenzke, N., and Moser, T. (2009). The Ca<sup>2+</sup> channel subunit beta2 regulates Ca<sup>2+</sup> channel abundance and function in inner hair cells and is required for hearing. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 10730–10740.
- Nelson, D.A., Stanton, M.E., and Freyman, R.L. (1983). A general equation describing frequency discrimination as a function of frequency and sensation level. *J. Acoust. Soc. Am.* *73*, 2117–2123.
- Nemoto, S., and Finkel, T. (2004). Ageing and the mystery at Arles. *Nature* *429*, 149–152.

- Noben-Trauth, K., Zheng, Q.Y., Johnson, K.R., and Nishina, P.M. (1997). *mdfw*: a deafness susceptibility locus that interacts with deaf waddler (*dfw*). *Genomics* 44, 266–272.
- Nondahl, D.M., Cruickshanks, K.J., Wiley, T.L., Klein, R., Klein, B.E., and Tweed, T.S. (2000). Recreational firearm use and hearing loss. *Arch. Fam. Med.* 9, 352–357.
- Nouvian, R., Beutner, D., Parsons, T.D., and Moser, T. (2006). Structure and function of the hair cell ribbon synapse. *J. Membr. Biol.* 209, 153–165.
- Obholzer, N., Wolfson, S., Trapani, J.G., Mo, W., Nechiporuk, A., Busch-Nentwich, E., Seiler, C., Sidi, S., Söllner, C., Duncan, R.N., et al. (2008). Vesicular glutamate transporter 3 is required for synaptic transmission in zebrafish hair cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 2110–2118.
- O’Brien, W.J., Lingrel, J.B., and Wallick, E.T. (1994). Ouabain binding kinetics of the rat alpha two and alpha three isoforms of the sodium-potassium adenosine triphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 310, 32–39.
- Oesterle, E., and Dallos, P. (1986). Intracellular recordings from supporting cells in the organ of Corti. *Hear. Res.* 22, 229–232.
- Ohlemiller, K.K., and Gagnon, P.M. (2007). Genetic dependence of cochlear cells and structures injured by noise. *Hear. Res.* 224, 34–50.
- Oliver, D.L. (2000). Ascending efferent projections of the superior olivary complex. *Microsc. Res. Tech.* 51, 355–363.
- Oliver, D., He, D.Z., Klöcker, N., Ludwig, J., Schulte, U., Waldegger, S., Ruppertsberg, J.P., Dallos, P., and Fakler, B. (2001). Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein. *Science* 292, 2340–2343.
- Oliver, D., Taberner, A.M., Thurm, H., Sausbier, M., Arntz, C., Ruth, P., Fakler, B., and Liberman, M.C. (2006). The role of BKCa channels in electrical signal encoding in the mammalian auditory periphery. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 6181–6189.
- Palombi, P.S., and Caspary, D.M. (1996). Responses of young and aged Fischer 344 rat inferior colliculus neurons to binaural tonal stimuli. *Hear. Res.* 100, 59–67.
- Pangrsic, T., Lasarow, L., Reuter, K., Takago, H., Schwander, M., Riedel, D., Frank, T., Tarantino, L.M., Bailey, J.S., Strenzke, N., et al. (2010). Hearing requires otoferlin-dependent efficient replenishment of synaptic vesicles in hair cells. *Nat. Neurosci.* 13, 869–876.
- Pangršič, T., Reisinger, E., and Moser, T. (2012). Otoferlin: a multi-C2 domain protein essential for hearing. *Trends Neurosci.* 35, 671–680.
- Parsons, T.D., Lenzi, D., Almers, W., and Roberts, W.M. (1994). Calcium-triggered exocytosis and endocytosis in an isolated presynaptic cell: capacitance measurements in saccular hair cells. *Neuron* 13, 875–883.
- Parthasarathy, A., Lai, J., and Bartlett, E.L. (2016). Age-Related Changes in Processing Simultaneous Amplitude Modulated Sounds Assessed Using Envelope Following Responses. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 17, 119–132.

- Pauler, M., Schuknecht, H.F., and White, J.A. (1988). Atrophy of the stria vascularis as a cause of sensorineural hearing loss. *The Laryngoscope* *98*, 754–759.
- Pedersen, K.E., Rosenhall, U., and Møller, M.B. (1989). Changes in pure-tone thresholds in individuals aged 70-81: results from a longitudinal study. *Audiol. Off. Organ Int. Soc. Audiol.* *28*, 194–204.
- Pichora-Fuller, M.K., Schneider, B.A., Macdonald, E., Pass, H.E., and Brown, S. (2007). Temporal jitter disrupts speech intelligibility: a simulation of auditory aging. *Hear. Res.* *223*, 114–121.
- Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., and Striessnig, J. (2000). Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell* *102*, 89–97.
- Portmann, M., Cazals, Y., Negrevergne, M., and Aran, J.M. (1980). Transtympanic and surface recordings in the diagnosis of retrocochlear disorders. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* *89*, 362–369.
- Puel, J.L. (1995). Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Prog. Neurobiol.* *47*, 449–476.
- Puel, J.L., and Rebillard, G. (1990). Effect of contralateral sound stimulation on the distortion product 2F1-F2: evidence that the medial efferent system is involved. *J. Acoust. Soc. Am.* *87*, 1630–1635.
- Puel, J.L., Bobbin, R.P., and Fallon, M. (1988). An ipsilateral cochlear efferent loop protects the cochlea during intense sound exposure. *Hear. Res.* *37*, 65–69.
- Rahko, T., Kallio, V., Kataja, M., Fagerström, K., and Karma, P. (1985). Prevalence of handicapping hearing loss in an aging population. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* *94*, 140–144.
- Relkin, E.M., and Doucet, J.R. (1991). Recovery from prior stimulation. I: Relationship to spontaneous firing rates of primary auditory neurons. *Hear. Res.* *55*, 215–222.
- Rhode, W.S., and Smith, P.H. (1985). Characteristics of tone-pip response patterns in relationship to spontaneous rate in cat auditory nerve fibers. *Hear. Res.* *18*, 159–168.
- Rickheit, G., Maier, H., Strenzke, N., Andreescu, C.E., De Zeeuw, C.I., Muenscher, A., Zdebik, A.A., and Jentsch, T.J. (2008). Endocochlear potential depends on Cl<sup>-</sup> channels: mechanism underlying deafness in Bartter syndrome IV. *EMBO J.* *27*, 2907–2917.
- Robertson, D. (1984). Horseradish peroxidase injection of physiologically characterized afferent and efferent neurones in the guinea pig spiral ganglion. *Hear. Res.* *15*, 113–121.
- Rose, J.E., Brugge, J.F., Anderson, D.J., and Hind, J.E. (1967). Phase-locked response to low-frequency tones in single auditory nerve fibers of the squirrel monkey. *J. Neurophysiol.* *30*, 769–793.
- Rosen, S. (1992). Temporal information in speech: acoustic, auditory and linguistic aspects. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *336*, 367–373.
- Rosen, S., Bergman, M., Plester, D., el-MOFTY, A., and Satti, M.H. (1962). Presbycusis study of a relatively noise-free population in the Sudan. *Trans. Am. Otol. Soc.* *50*, 135–152.
- Rosenhall, U., Pedersen, K., and Svanborg, A. (1990). Presbycusis and noise-induced hearing loss. *Ear Hear.* *11*, 257–263.

- Roux, I., Safieddine, S., Nouvian, R., Grati, M., Simmler, M.-C., Bahloul, A., Perfettini, I., Le Gall, M., Rostaing, P., Hamard, G., et al. (2006). Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell* 127, 277–289.
- Roux, I., Hosie, S., Johnson, S.L., Bahloul, A., Cayet, N., Nouaille, S., Kros, C.J., Petit, C., and Safieddine, S. (2009). Myosin VI is required for the proper maturation and function of inner hair cell ribbon synapses. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4615–4628.
- Ruel, J., Nouvian, R., Gervais d’Aldin, C., Pujol, R., Eybalin, M., and Puel, J.L. (2001). Dopamine inhibition of auditory nerve activity in the adult mammalian cochlea. *Eur. J. Neurosci.* 14, 977–986.
- Ruel, J., Wang, J., Demêmes, D., Gobaille, S., Puel, J.-L., and Rebillard, G. (2006). Dopamine transporter is essential for the maintenance of spontaneous activity of auditory nerve neurones and their responsiveness to sound stimulation. *J. Neurochem.* 97, 190–200.
- Ruel, J., Emery, S., Nouvian, R., Bersot, T., Amilhon, B., Van Rybroek, J.M., Rebillard, G., Lenoir, M., Eybalin, M., Delprat, B., et al. (2008). Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 278–292.
- Ruggles, D., Bharadwaj, H., and Shinn-Cunningham, B.G. (2012). Why middle-aged listeners have trouble hearing in everyday settings. *Curr. Biol. CB* 22, 1417–1422.
- Russell, I.J., and Sellick, P.M. (1978). Intracellular studies of hair cells in the mammalian cochlea. *J. Physiol.* 284, 261–290.
- Russell, I.J., and Sellick, P.M. (1983). Low-frequency characteristics of intracellularly recorded receptor potentials in guinea-pig cochlear hair cells. *J. Physiol.* 338, 179–206.
- Rutherford, M.A., and Roberts, W.M. (2006). Frequency selectivity of synaptic exocytosis in frog saccular hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2898–2903.
- Rutherford, M.A., Chapochnikov, N.M., and Moser, T. (2012). Spike encoding of neurotransmitter release timing by spiral ganglion neurons of the cochlea. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 4773–4789.
- Ryugo, D.K., and Rouiller, E.M. (1988). Central projections of intracellularly labeled auditory nerve fibers in cats: morphometric correlations with physiological properties. *J. Comp. Neurol.* 271, 130–142.
- Schaette, R., and McAlpine, D. (2011). Tinnitus with a normal audiogram: physiological evidence for hidden hearing loss and computational model. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 13452–13457.
- Schmiedt, R.A. (1989). Spontaneous rates, thresholds and tuning of auditory-nerve fibers in the gerbil: comparisons to cat data. *Hear. Res.* 42, 23–35.
- Schmiedt, R.A., Mills, J.H., and Boettcher, F.A. (1996). Age-related loss of activity of auditory-nerve fibers. *J. Neurophysiol.* 76, 2799–2803.
- Schmiedt, R.A., Okamura, H.-O., Lang, H., and Schulte, B.A. (2002). Ouabain application to the round window of the gerbil cochlea: a model of auditory neuropathy and apoptosis. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 3, 223–233.



- Schmitz, F., Königstorfer, A., and Südhof, T.C. (2000). RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron* 28, 857–872.
- Schmolesky, M.T., Wang, Y., Pu, M., and Leventhal, A.G. (2000). Degradation of stimulus selectivity of visual cortical cells in senescent rhesus monkeys. *Nat. Neurosci.* 3, 384–390.
- Schnee, M.E., Lawton, D.M., Furness, D.N., Benke, T.A., and Ricci, A.J. (2005). Auditory hair cell-afferent fiber synapses are specialized to operate at their best frequencies. *Neuron* 47, 243–254.
- Schneider, B.A., Pichora-Fuller, M.K., Kowalchuk, D., and Lamb, M. (1994). Gap detection and the precedence effect in young and old adults. *J. Acoust. Soc. Am.* 95, 980–991.
- Seal, R.P., Akil, O., Yi, E., Weber, C.M., Grant, L., Yoo, J., Clause, A., Kandler, K., Noebels, J.L., Glowatzki, E., et al. (2008). Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. *Neuron* 57, 263–275.
- Sergeyenko, Y., Lall, K., Liberman, M.C., and Kujawa, S.G. (2013). Age-related cochlear synaptopathy: an early-onset contributor to auditory functional decline. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 13686–13694.
- Sewell, W.F. (1984). The relation between the endocochlear potential and spontaneous activity in auditory nerve fibres of the cat. *J. Physiol.* 347, 685–696.
- Shannon, R.V., Zeng, F.G., Kamath, V., Wygonski, J., and Ekelid, M. (1995). Speech recognition with primarily temporal cues. *Science* 270, 303–304.
- Sheets, L., Trapani, J.G., Mo, W., Obholzer, N., and Nicolson, T. (2011). Ribeye is required for presynaptic Ca<sub>v</sub>1.3a channel localization and afferent innervation of sensory hair cells. *Dev. Camb. Engl.* 138, 1309–1319.
- Sidi, S., Busch-Nentwich, E., Friedrich, R., Schoenberger, U., and Nicolson, T. (2004). gemini encodes a zebrafish L-type calcium channel that localizes at sensory hair cell ribbon synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 4213–4223.
- Siegel, J.H. (1992). Spontaneous synaptic potentials from afferent terminals in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 59, 85–92.
- Simon, H., Frisina, R.D., and Walton, J.P. (2004). Age reduces response latency of mouse inferior colliculus neurons to AM sounds. *J. Acoust. Soc. Am.* 116, 469–477.
- Smith, Z.M., Delgutte, B., and Oxenham, A.J. (2002). Chimaeric sounds reveal dichotomies in auditory perception. *Nature* 416, 87–90.
- Snell, K.B. (1997). Age-related changes in temporal gap detection. *J. Acoust. Soc. Am.* 101, 2214–2220.
- Snell, K.B., and Frisina, D.R. (2000). Relationships among age-related differences in gap detection and word recognition. *J. Acoust. Soc. Am.* 107, 1615–1626.
- Spoendlin, H. (1969). Innervation patterns in the organ of corti of the cat. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 67, 239–254.
- Spoendlin, H. (1972). Innervation densities of the cochlea. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 73, 235–248.



- Starr, A., McPherson, D., Patterson, J., Don, M., Luxford, W., Shannon, R., Sininger, Y., Tonakawa, L., and Waring, M. (1991). Absence of both auditory evoked potentials and auditory percepts dependent on timing cues. *Brain J. Neurol.* *114 ( Pt 3)*, 1157–1180.
- Starr, A., Picton, T.W., Sininger, Y., Hood, L.J., and Berlin, C.I. (1996). Auditory neuropathy. *Brain J. Neurol.* *119 ( Pt 3)*, 741–753.
- Taberner, A.M., and Liberman, M.C. (2005). Response properties of single auditory nerve fibers in the mouse. *J. Neurophysiol.* *93*, 557–569.
- Tabuchi, K., Suzuki, M., Mizuno, A., and Hara, A. (2005). Hearing impairment in TRPV4 knockout mice. *Neurosci. Lett.* *382*, 304–308.
- Takahashi, G.A., and Bacon, S.P. (1992). Modulation detection, modulation masking, and speech understanding in noise in the elderly. *J. Speech Hear. Res.* *35*, 1410–1421.
- Tarnowski, B.I., Schmiedt, R.A., Hellstrom, L.I., Lee, F.S., and Adams, J.C. (1991). Age-related changes in cochleas of mongolian gerbils. *Hear. Res.* *54*, 123–134.
- Tasaki, I. (1954). Nerve impulses in individual auditory nerve fibers of guinea pig. *J. Neurophysiol.* *17*, 97–122.
- Ter-Mikaelian, M., Sanes, D.H., and Semple, M.N. (2007). Transformation of temporal properties between auditory midbrain and cortex in the awake Mongolian gerbil. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 6091–6102.
- Ter-Mikaelian, M., Semple, M.N., and Sanes, D.H. (2013). Effects of spectral and temporal disruption on cortical encoding of gerbil vocalizations. *J. Neurophysiol.* *110*, 1190–1204.
- Tlumak, A.I., Durrant, J.D., and Delgado, R.E. (2015). The Effect of Advancing Age on Auditory Middle- and Long-Latency Evoked Potentials Using a Steady-State-Response Approach. *Am. J. Audiol.* *24*, 494–507.
- Tsuji, J., and Liberman, M.C. (1997). Intracellular labeling of auditory nerve fibers in guinea pig: central and peripheral projections. *J. Comp. Neurol.* *381*, 188–202.
- Tucker, T., and Fettiplace, R. (1995). Confocal imaging of calcium microdomains and calcium extrusion in turtle hair cells. *Neuron* *15*, 1323–1335.
- Turner, C.W., Souza, P.E., and Forget, L.N. (1995). Use of temporal envelope cues in speech recognition by normal and hearing-impaired listeners. *J. Acoust. Soc. Am.* *97*, 2568–2576.
- Verpy, E., Leibovici, M., Zwaenepoel, I., Liu, X.Z., Gal, A., Salem, N., Mansour, A., Blanchard, S., Kobayashi, I., Keats, B.J., et al. (2000). A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C. *Nat. Genet.* *26*, 51–55.
- Vetter, D.E., Mann, J.R., Wangemann, P., Liu, J., McLaughlin, K.J., Lesage, F., Marcus, D.C., Lazdunski, M., Heinemann, S.F., and Barhanin, J. (1996). Inner ear defects induced by null mutation of the *isk* gene. *Neuron* *17*, 1251–1264.
- Walton, J.P. (2010). Timing is everything: temporal processing deficits in the aged auditory brainstem. *Hear. Res.* *264*, 63–69.

- Walton, J.P., Simon, H., and Frisina, R.D. (2002). Age-related alterations in the neural coding of envelope periodicities. *J. Neurophysiol.* *88*, 565–578.
- Wan, L., Almers, W., and Chen, W. (2005). Two ribeye genes in teleosts: the role of Ribeye in ribbon formation and bipolar cell development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 941–949.
- Wang, J., and Puel, J.-L. (2008). From cochlear cell death pathways to new pharmacological therapies. *Mini Rev. Med. Chem.* *8*, 1006–1019.
- Warren, L.R., Wagener, J.W., and Herman, G.E. (1978). Binaural analysis in the aging auditory system. *J. Gerontol.* *33*, 731–736.
- Weil, D., Blanchard, S., Kaplan, J., Guilford, P., Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Levilliers, J., and Weston, M.D. (1995). Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* *374*, 60–61.
- Weil, D., Küssel, P., Blanchard, S., Lévy, G., Levi-Acobas, F., Drira, M., Ayadi, H., and Petit, C. (1997). The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat. Genet.* *16*, 191–193.
- Weisz, C.J.C., Lehar, M., Hiel, H., Glowatzki, E., and Fuchs, P.A. (2012). Synaptic transfer from outer hair cells to type II afferent fibers in the rat cochlea. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 9528–9536.
- Welford, A.T. (1984). Between bodily changes and performance: some possible reasons for slowing with age. *Exp. Aging Res.* *10*, 73–88.
- Willott, J.F., Hnath Chisolm, T., and Lister, J.J. (2001). Modulation of presbycusis: current status and future directions. *Audiol. Neurootol.* *6*, 231–249.
- Winter, I.M., Robertson, D., and Yates, G.K. (1990). Diversity of characteristic frequency rate-intensity functions in guinea pig auditory nerve fibres. *Hear. Res.* *45*, 191–202.
- Wong, A.B., Rutherford, M.A., Gabrielaitis, M., Pangrsic, T., Göttfert, F., Frank, T., Michanski, S., Hell, S., Wolf, F., Wichmann, C., et al. (2014). Developmental refinement of hair cell synapses tightens the coupling of Ca<sup>2+</sup> influx to exocytosis. *EMBO J.* *33*, 247–264.
- Yasunaga, S., Grati, M., Cohen-Salmon, M., El-Amraoui, A., Mustapha, M., Salem, N., El-Zir, E., Loiselet, J., and Petit, C. (1999). A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat. Genet.* *21*, 363–369.
- Yu, S., Wang, Y., Li, X., Zhou, Y., and Leventhal, A.G. (2006). Functional degradation of extrastriate visual cortex in senescent rhesus monkeys. *Neuroscience* *140*, 1023–1029.
- Yuhas, W.A., and Fuchs, P.A. (1999). Apamin-sensitive, small-conductance, calcium-activated potassium channels mediate cholinergic inhibition of chick auditory hair cells. *J. Comp. Physiol. [A]* *185*, 455–462.
- Zeng, F.-G., Kong, Y.-Y., Michalewski, H.J., and Starr, A. (2005). Perceptual consequences of disrupted auditory nerve activity. *J. Neurophysiol.* *93*, 3050–3063.
- Zenisek, D., Davila, V., Wan, L., and Almers, W. (2003). Imaging calcium entry sites and ribbon structures in two presynaptic cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 2538–2548.

Zenisek, D., Horst, N.K., Merrifield, C., Sterling, P., and Matthews, G. (2004). Visualizing synaptic ribbons in the living cell. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 9752–9759.

Zettel, M.L., O'Neill, W.E., Trang, T.T., and Frisina, R.D. (2001). Early bilateral deafening prevents calretinin up-regulation in the dorsal cortex of the inferior colliculus of aged CBA/CaJ mice. *Hear. Res.* *158*, 131–138.

Zhao, H.B., and Santos-Sacchi, J. (1999). Auditory collusion and a coupled couple of outer hair cells. *Nature* *399*, 359–362.

Zheng, J., Shen, W., He, D.Z., Long, K.B., Madison, L.D., and Dallos, P. (2000). Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* *405*, 149–155.

Zheng, Q.Y., Yan, D., Ouyang, X.M., Du, L.L., Yu, H., Chang, B., Johnson, K.R., and Liu, X.Z. (2005). Digenic inheritance of deafness caused by mutations in genes encoding cadherin 23 and protocadherin 15 in mice and humans. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 103–111.

Zhong, Y., Hu, Y., Peng, W., Sun, Y., Yang, Y., Zhao, X., Huang, X., Zhang, H., and Kong, W. (2012). Age-related decline of the cytochrome c oxidase subunit expression in the auditory cortex of the mimetic aging rat model associated with the common deletion. *Hear. Res.* *294*, 40–48.

## 8. Remerciements

En premier lieu, merci aux professeurs Alain CHAYS et Stéphane ROMAN d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. C'est un véritable honneur de bénéficier de votre expertise pour discuter de ce travail.

Je remercie Jean-Luc PUEL d'avoir accepté de diriger cette thèse. Merci pour la création du master « audiologie et troubles du langage » qui permet depuis une dizaine d'année à des audioprothésistes comme moi de participer à des projets de recherche et de poursuivre en thèse. Sans sa volonté, le master n'aurait pas été créé. Merci pour ses conseils, son soutien, le partage de son expérience, et de sa vision du monde scientifique et générale, merci pour son rire qui motive et sa passion communicative, particulièrement lors de la chirurgie où chacune de ces démonstrations était un vrai régal. Merci également pour sa patience, de ne m'avoir jamais lâché et les moyens qu'il a mis à ma disposition. Merci tout simplement de m'avoir laissé ma chance en m'ayant pris en thèse, et ainsi pratiquer, au moins une fois dans ma vie, la recherche qui était mon rêve d'enfant. Merci de m'avoir permis de confronter mes rêves à la réalité et ainsi de m'avoir fait grandir. Le métier que vous pratiquez est difficile, fastidieux et frustrant mais indispensable à notre société. Heureusement, il est auréolé parfois de grands bonheurs lorsqu'on trouve.

Je remercie Jerome BOURIEN d'avoir accepté de m'encadrer pendant ma thèse, ce qui n'était pas simple car il avait déjà beaucoup de travail. Merci pour ce que tu m'as transmis en électrophysiologie, en traitement de signal et de données (Matlab et LabVIEW), ainsi que pour les présentations orales ou écrites. Merci également pour ta patience, tes conseils organisationnels et ta rigueur qui m'auront grandement servi et, je pense, me serviront toujours. Merci d'avoir tenu tes engagements vis-à-vis de moi jusqu'au bout. Merci pour la tape derrière l'épaule pour me motiver en manip, les VAMOS libérateurs du déjeuner le midi, ton énergie communicative et la pêche que tu as en permanence. Merci pour tes références au foyer de l'INSA, merci pour tes chansons à la guitare en soirée.

Je remercie Régis NOUVIAN sans qui je n'aurai pas réussi à être accepté en thèse. Merci pour tes nombreux conseils, ton humour, ton soutien humain indéfectible, voire même logistique durant mes 7 années à Montpellier en particulier la dernière année. Merci de m'avoir encadré les 2 ans de stage en master qui m'ont excellemment mis sur les rails pour la thèse. Merci pour tout ce que tu m'as infusé pendant ces 2 années que ce soit en méthodes de travail ou en culture scientifique et même culture

tout court. Merci de m'avoir appris à faire des présentations orales (les fameuses répét'). Merci pour ton intégrité personnel et professionnel.

Merci à l'équipe du CNPS, Boris GOUREVITCH (Paris Saclay) et son thésard Florian OCCELLI, ainsi que Jean-Marc EDELIN de m'avoir permis de participer à leur étude sur le vieillissement des rats, de m'avoir accueilli pour visiter leurs installations fin 2014. Un énorme merci à Boris pour son soutien, sa culture, son intégrité, son courage et son enthousiasme tout au long de cette étude et lors des comités de thèse.

Je remercie l'entreprise ENTENDRE de m'avoir fait confiance en finançant cette étude. Merci à Romain TUDUAL ainsi que son épouse Agnès pour leur confiance, leur clarté, leur fiabilité, leur stabilité, leur écoute, leur patience, leurs conseils et le poste proposé à la fin de mon contrat de thèse, également bien sûr pour leur souplesse et leur soutien humain indéfectible durant ses années Montpelliéraines et particulièrement depuis mon retour à Rennes. Merci également à l'équipe du siège d'ENTENDRE (GIPA2), en particulier Laurent CROS et Fabienne DESABRES, qui ont toujours su être à l'écoute et réactifs. Merci pour leurs qualités humaines, leur soutien, leur patience durant cette longue aventure. Merci aux 3 présidents d'ENTENDRE qui se sont succédés entre le début (1<sup>er</sup> mars 2013) et la fin de cette thèse (novembre 2017) : Romain TUDUAL, puis Jean-Robert FIOLEAU et l'actuel, Laurent PIRON, pour leur écoute, leur patience, leurs conseils et leur compréhension durant ce projet plus long que prévu.

Je tiens à souligner la fidélité et la loyauté de Romain TUDUAL qui m'a donné ma chance en tant qu'audioprothésiste à la sortie de mon diplôme en 2008. Il a écouté et cru en mon projet. Ainsi après avoir travaillé un peu plus d'un an chez lui, j'ai repris mes études en master. Le master s'étant bien passé, l'entreprise Sanofi était d'accord pour financer ma thèse. Comme j'étais audioprothésiste et que j'avais déjà travaillé chez ENTENDRE, nous avons demandé le financement à ENTENDRE qui a accepté. Ainsi un grand merci à Romain TUDUAL de m'avoir accompagné, appuyé et approuvé tout au long de ce projet de presque 10 ans.

Merci infiniment à Gilles GUILLARM sans qui rien n'aurait été possible et sans qui je n'aurais jamais pensé à faire une thèse. Ma rencontre avec toi en 2006 a été décisive. Tu m'as donné un espoir professionnel, une ambition afin d'améliorer la prise en charge des malentendants en pratique. Tu m'as montré la voie à suivre pour y parvenir et prodigué de nombreux conseils quand tu étais encore avec nous. Tu m'as aussi encouragé à faire le master. Ça a été une inestimable chance de te rencontrer.

J'aurai été tellement heureux que tu sois présent le jour de la soutenance. Merci à Nathalie pour les mots toujours gentils et compréhensifs durant cette aventure.

Merci à Benoit GODEY pour sa qualité, la voie qu'il montre et la mentalité qu'il transmet lors de ses cours à Fougères. Lors de mon stage dans son service (2006) et lors de mon mémoire sur les implants cochléaires (2008) dans ce même service, les fréquentes conversations qu'il avait avec Gilles GUILLARM et Frank LEFEVRE, réglEURS d'implant, ou encore avec Bénédicte PHILIBERT ou Michel BELIAEFF, de la société Med-El, m'ont révélé ma vocation : je ferai tout ce qui est en mon pouvoir pour aider les malentendants. A mon humble niveau, je participerai à l'amélioration de la prise en charge du malentendant et cela me comblera. Je suis convaincu que la société a tout à gagner, que ce soit sur le plan économique ou social, à ce que les malentendants, en particulier les presbyacousiques, soient bien pris en charge et heureux.

Un grand merci à Jean-Pierre PIRON de m'avoir offert la chance de régler des implants cochléaires au CHU de Montpellier en 2011-2012 entre la fin du master et le début de la thèse : expérience enrichissante et qui tombait à pic ! A la fin du master, mes encadrants à l'INM me proposaient de partir 1 an en Allemagne dans le labo de Tobias MOSER et Nicola STRENZKE à Göttingen pour y apprendre la mesure de la fibre unitaire chez la souris. Le problème était qu'évidemment il n'y avait pas de financement pour ma compagne qui était enceinte de notre 1<sup>er</sup> enfant. Ta proposition de poste quelques mois après le projet proposé par l'INM tombait donc très bien. Merci pour tes qualités humaines, ton humour et ton ouverture d'esprit. Sans t'en rendre compte, tu as été un soutien important pour moi lors de cette période charnière et incertaine. Les quelques discussions que nous avons eu en fin d'après-midi dans ton bureau, notamment ton partage d'expérience sur ta vie au début des années 80 et l'arrivée de ton 1<sup>er</sup> enfant, m'ont grandement aidé par la suite.

Merci à Frédéric VENAIL de s'être mis en quatre pour m'accompagner à St Cyr L'école en décembre 2011 pour expliquer le projet de thèse au conseil d'administration du groupe ENTENDRE. Sans ta présence, l'issue aurait peut-être été différente. Merci également de m'avoir accueilli en 2012 et début 2013 à IPaudiOM, la plateforme clinique de l'unité INSERM U1051 au CHU Gui de Chauliac à Montpellier et de m'avoir permis d'être audiométriste adulte & enfants dans le service ORL à cette période.

Merci à Paul AVAN pour ces quelques mots d'encouragement et réconfortant en novembre 2016 lors d'une formation sur Paris où il m'expliquait quelques chemins surprenants qu'avaient pris sa carrière.

Merci au camp du patch-clamp de Régis, à savoir Gaston SENDIN et Marie GUILLET, un lieu baigné de musique et de culture. Merci à Gaston, the post-Doc man, pour son humour, sa culture, son soutien, ses conseils methodo et ses nombreuses discussions passionnantes lors des pauses déjeuner, ou autour d'une bière le soir ainsi que cette colocation de quelques mois en fin de master très enrichissante et remplie de bonheur. Merci à Marie pour les discussions philosophiques qu'on a partagé et de son soutien durant ces années montpelliéraines.

Merci à Charlène BATREL pour les enregistrements unitaires, de m'avoir montré la chirurgie du plot et la perfusion de la ouabaine ainsi que toute son aide en général. Je te souhaite une bonne continuation dans ton nouveau poste.

Merci à Antoine HUET et Gilles DESMADRYL pour les enregistrements unitaires ainsi que l'aide sur la startle-response pour Antoine. Merci Gilles pour tes conseils, le partage de ton expérience et les passionnantes discussions en salles de manips quand on se croisait à 5h du mat.

Merci à Marisa TEIGELL du service histologie de l'INM pour avoir fixé et prélevé les cochlées et cerveaux de tous les rats durant ces 3 années, avec efficacité, bonne humeur, et une grande souplesse sur le planning quand ma manip prenait du retard. Merci à Chantal RIPOL et Isabelle SASSETTI pour la qualité du service histologie.

Merci à Lucie BILLET pour son remarquable travail qu'elle a effectué en stage de master à l'INM sur le codage de l'enveloppe temporelle chez la gerbille ainsi que son travail de master2, tout aussi remarquable, sur la détection de l'enveloppe chez l'humain.

Merci Clément SUREL pour ta culture ciné, ta sympathie et ton humour ainsi que le comptage des synapses. Bonne continuation dans ton post-doc au pays de Legoland.

Merci à Yong TANG, alias « la banane, la pêche, la frite » pour son énorme travail sur la ouabain, tous ses conseils en chirurgie notamment ceux d'octobre 2015 en dernière année et son soutien.

Merci à Michel EYBALIN de s'être occupé de l'immunologie des cochlées de rats, le partage de son expérience et ses conseils.



Merci à super Hideaki OGITA, pour tous les conseils qu'il a pu me donner en chirurgie, electrophy, pour son aide sur la startle-response et sa sympathie.

Merci à Sandrine URVOY, secrétaire de l'école doctorale CBS2, pour son écoute, sa disponibilité, sa sympathie et son efficacité tout au long de la thèse.

Merci à Michel DESARMENIEN pour son implication et son écoute ainsi que pour l'organisation de la formation théorique d'électrophysiologie de 4 jours très conviviale organisée à Sète.

Merci à David GUIRAUD d'avoir accepté d'être membre de mon comité de suivi de thèse, pour ses conseils en traitement de signal et humains.

Merci à Patrice QUINTANA pour son soutien moral, son humour, sa culture du rugby et le partage de son expérience pendant ces années.

Merci à Jing WANG pour ses nombreux conseils en chirurgie et en pharmacologie ainsi que sa gentillesse.

Merci à Marc LENOIR pour ses nombreux conseils, sa gentillesse, et son immense connaissance de l'anatomie cochléaire ainsi que l'aide pour les prélèvements. Merci aussi de m'avoir fait participer à des interventions de prévention et de vulgarisation aux collèges Clémence Royer et Camille Claudel sur Montpellier.

Merci à Sabine LADRECH pour les conseils, l'aide quant au matériel de chirurgie.

Merci à Cédric RAOUL pour son humour à chaque rencontre dans les couloirs de l'INM.

Benjamin DELPRAT pour son humour, les discussions pertinentes, ses chansons, sa culture en biologie moléculaire et surtout ses questions « qui tuent » pour les oraux.

Merci à Guy REBILLARD pour mister culture neurobiologie, la mémoire du labo, son aide pour l'utilisation et l'analyse des produits de distorsion, et pour le millier de petites choses, astuces qui permettent de gagner du temps. En espérant que tu profites bien de ta retraite désormais.

Merci à Sahia DODO pour ses conseils en immuno et dissection ainsi que sa gentillesse.

Merci à Julien MENARDO, el profesor, pour ses nombreux conseils en dissection et electrophy, son partage d'expérience et sa bonne humeur permanente.

Merci à Salim BENLEFKI collègue de l'équipe motoneurone pour ses phrases clés, son moral d'acier, son humour et sa pêche permanente.

Merci à Caroline DRYBURGH pour son passage de 2 ans à l'INM en stage de master, son humour et tous ces bons moments passés à la paillasse.

Merci à Eléa LAMBLIN pour ses conseils en chirurgie et sa sympathie.

Merci à Nesrine BENKAFADAR pour l'écoute, les discussions, conseils et ses qualités humaines lorsqu'on se croisait en physio ou au module 2. Merde pour ta soutenance en janvier prochain et en te souhaitant du succès pour ton post-doc à venir à Stanford.

Merci à Sophie GUEIFI et Willy JOLY pour l'organisation régulière des Phd Meeting, moment convivial qui faisaient du bien, permettaient de voir le travail des autres doctorants et surtout les pizzas et les bières gratuites !

Merci au service Animalerie dirigé par Jerome SARNIGUET, toujours de qualité et d'une grande souplesse. Merci à Flora, Pascal (vive le foot !), John, Marie-Line, Julien et Laura. La qualité de leur travail m'a permis la réalisation de toutes mes manip dans les temps.

Merci à Jean-Philippe LEYRIS, Isabelle ROBELS pour leur humour, Céline SALSAC, Ali SALEH et Laurent GUILLOU (le meilleur joueur de Ping Pong de l'INM d'après Ali, l'organisateur du tournoi de l'institut) pour leur bonne humeur à chaque fois qu'on se croisait dans les couloirs.

Merci à Dominique VIDAL pour sa disponibilité, et sa compréhension quand je faisais sonner involontairement l'alarme à l'INM la nuit, merci pour tes conseils et les nombreuses discussions enrichissantes que nous avons eues.

Merci aux autres étudiants en thèse et les post-doc, Emilie, Stéphanie, Gaby, Carolanne, Piotr, Yulia de l'équipe audition mais aussi ceux des autres équipes de l'institut Sophie, Ali (organisateur du international INM Ping Pong Tournament), Safa, mais aussi les nombreux étudiants en stage de master.

Merci à Rachel FOUGERE du service laverie pour sa gentillesse et sa sympathie.

Merci à Jeremy BONNET pour les multiples services pratiques qu'il m'a rendu et toujours dans la bonne humeur et son humour.

Merci à Sophie BAIZE du magasin pour avoir toujours répondu à mes demandes.

Merci à Véronique BRUGIOTI, Agnes BARTHOUX, Audrey BARREDA, Clélia ROCCA ainsi que Claudine BOUJOT aux services administratifs et financiers de l'INM, toujours de bonne humeur et efficace.

Merci au service informatique de l'INM, à Richard DUHAMEL, toujours prompt à mes demandes les plus farfelues & Ibrahim TADJOU pour leur efficacité et leur bonne humeur.

Merci à l'ancien photographe de l'INM, aujourd'hui en retraite, Jean-Louis PASQUIER pour sa culture, son ouverture d'esprit et son aide à la finalisation des posters et leur impression.

Merci à mes collègues de bureau, Christophe MICHEL (merci pour les conseils en Matlab, ta bonne humeur et ton humour trash), Florence FRANCOIS (merci d'avoir toujours répondu à mes demandes dans le module 2 et nos interrogations administratives communes) et aux salariés de SENSORION qui ont partagé notre bureau pendant 1 année pour leur bonne humeur et leur humour Stéphanie, Sophie, Aurélie, Clémentine, et bien sûr le fameux Désiré.

Merci à Jean-Charles CECCATO pour ses conseils en traitement de signal, Matlab, sur ma thèse en général, son aide méthodologique, sa constance et son humour.

Merci à Antoine LORENZI et Anthony GENTIL, les thésards d'IPaudioM, pour leur accueil lors de mon passage à IPaudioM, leur soutien, leurs conseils ainsi qu'aux étudiants en stage de master croisés là-bas.

Merci à Jérôme RUEL pour ses mots d'encouragement et conseils quand je perfusais du Salicylate In Vivo dans des cochlées de cochons d'Inde en master ainsi que pour la qualité de ses cours en master.

Merci à Rémy PUJOL pour sa passion, le partage d'expériences et la création du site « voyage au centre de l'audition » ([cochlea.eu](http://cochlea.eu)) à destination des professionnels et du grand public.

Merci à Michel MONDAIN pour la qualité de ses cours et, lorsque je travaillais dans son service en tant régleur d'implant, pour ses conseils sur l'organisation de mon planning de thèse avec l'arrivée d'un 1<sup>er</sup> enfant.

Merci à Huan JIA croisé en physio lors de sa fin de thèse et ses conseils sur la manipulation et chirurgie des rats.

Merci à Alain GHIO pour ses cours pertinent en master ainsi que pour la discussion enrichissante sur mon poster qu'on a pu avoir lors des journées de phonétique clinique en 2015.

Merci à Bertrand FONTAINE pour les discussions pertinentes sur mes résultats lors de son passage à l'INM, ses travaux sur les noyaux cochléaires de gerbille, son humour et sa vision de la société.

Merci à Primoz PIRIH pour son enthousiasme, son humour et ses conseils lors de son passage sur Montpellier à chasser les papillons. Merci notamment pour cette soirée en juin 2010 passé au pub O'Carolans avec des algériens, des américains, des anglais et donc 1 slovène (Primoz) pour le dernier match de poule en coupe du monde de football. Toutes les nationalités du groupe étaient représentées.

Merci à Paul FUCHS pour l'ensemble de son œuvre et notamment ses travaux sur le vieillissement des efférences médianes ainsi que pour la discussion enrichissante qu'on avait eu lors d'un dîner sur Paris au congrès des audioprothésistes en 2014.

Merci à Sharon KUJAWA pour la discussion enrichissante, ses conseils et son écoute lorsque je lui ai présenté mes travaux lors de sa venue à Montpellier en 2015. Merci également pour l'ensemble de ses remarquables travaux sur les surdités cachées.

Merci à Christian LORENZI pour l'ensemble de ses travaux et d'avoir toujours un mot sympa lors de nos rencontres annuelles. Merci à Nihaad PARAOUTY pour sa sympathie et ses travaux sur le codage de l'enveloppe par les noyaux cochléaires.

Merci à Philip JORIS pour son énorme travail sur le codage de l'enveloppe temporelle par le système auditif, une source d'inspiration permanente.

Merci à Michael Charles LIBERMAN pour son énorme travail sur le système auditif périphérique depuis des décennies.

Merci à Stéphane MAISON pour ses remarquables travaux sur les efférences.

Merci à Harold SCHUKNECHT pour son énorme travail sur la presbyacousie périphérique. Merci également à Joseph HAWKINS et Kevin OHLEMILLER pour leur passionnant travaux sur le vieillissement de l'organe périphérique de l'audition.

Merci à Maria TER-MIKAELIAN et Dan SANES pour leurs travaux sur les vocalisations de gerbille.

Merci à Peter DALLOS pour l'ensemble de ses travaux.

Merci à Hari BHARADWAJ pour ses articles sur l'enveloppe temporelle qui m'ont fortement inspiré.

Merci à Jos EGGERMONT pour la qualité et la quantité de ses travaux sur la perception auditive depuis plus de 40 ans.

Merci à Barbara SHINN-CUNNINGHAM pour ses travaux sur l'attention sélective.

Merci à Daniel PRESSNITZER pour ses travaux et ses présentations qui m'ont inspiré.

Merci à Piet MERTENS pour ses travaux sur le glissando intra-syllabique.

Merci Andrew OXENHAM pour ses travaux sur le codage du fondamental laryngé.

Merci à Albert BREGMAN pour ses travaux sur l'analyse des scènes auditives.

Merci à Jim JERGER, l'idole de tout un peuple, pour ses travaux sur le traitement temporel dans la perception auditive.

Merci à Nicolas GRIMAUULT et Christophe MICHEYL pour leurs travaux qui m'ont fait rêver.

Merci à Mickael MENARD pour ses remarques pertinentes sur mes posters au congrès UNSAF et sur ses travaux en thèse sur les ASSR.

Merci à Céline RICHARD et à Marjorie DOLE pour leurs travaux de thèse sur la compréhension de la parole dans le bruit.

Merci à Pierre YGER pour ses travaux très inspirants sur l'activité spontanée.

Merci à Bénédicte PHILIBERT et Michel BELIAEFF, la Med-El team, croisés lors de mon mémoire sur les implants cochléaires, pour les conseils et les mots sympa à chaque fois qu'on se croisait en congrès. Ils font partie des personnes qui m'ont donné envie d'approfondir mes connaissances sur l'audition.

Merci Fabien SELDRAN, société Med-EL, qui en une discussion à un congrès sur le stand Med-EL m'a ouvert sur une autre vision de mes résultats du codage de l'enveloppe au cours du vieillissement et merci pour le livre de Bregman et sa collection d'articles JASA !

Merci à Christian FULLGRABE pour ses travaux sur la perception de l'enveloppe temporelle chez les dyslexiques.

Merci à Arnaud COEZ pour son implication dans l'amélioration de la prise en charge du malentendant et l'organisation de la branche scientifique au collège national d'audioprothèse et au congrès UNSAF.

Merci à Eric BIZAGUET pour son cursus qui m'a inspiré et son rôle dans le développement de la prise en charge du malentendant.

Merci à Marie-Christine GROUAZEL, l'ancienne directrice de l'école d'audioprothésistes J.E. Bertin, pour ses grandes qualités humaines, ses conseils, et de m'avoir laissé ma chance à l'oral du concours d'entrée, ma trajectoire en aurait été fort différente. Ce fut toujours un plaisir d'échanger avec vous durant mes 6 années à Fougères avec vous. Profitez bien de votre retraite.

Merci à Stéphane LAURENT pour son soutien, sa culture technique, son esprit ouvert et ses qualités humaines. Merci également aux différents intervenants de l'école J.E. Bertin de Fougères pour la qualité de l'enseignement et l'ambiance saine qui y règne.

Merci à Frank LEFEVRE pour la qualité de ses cours à Fougères et d'avoir été mon maître de mémoire en fin d'études d'audioprothèse. Merci de m'avoir proposé ce sujet sur l'implant cochléaire Med-EL et de m'avoir donné accès à sa fameuse bibliothèque comprenant sa thèse en phonétique et tous les mémoires et études qu'il a dirigés, une mine d'or pour un étudiant en soif de culture sur la réhabilitation auditive. Tous ces mémoires tirent dans le bon sens, merci. Merci de m'avoir répondu quand je lui ai dit que j'aimerais faire une thèse « Si c'est vraiment ce que tu souhaites, tu y arriveras ». Sur le coup, j'ai trouvé cette phrase étrange, aujourd'hui je la comprends.

Merci à Jean-Pierre FOGEL qui lors d'une conversation à un congrès il y a 3 ans (2014) m'a fait partager son expérience des malentendants et m'a expliqué ce qui serait intéressant à tester. Lors de la rédaction, 3 ans après, ses mots me sont revenus et m'ont permis de trouver une partie du fil de l'histoire de mon manuscrit. La vérité vient souvent de la clinique.

Merci à Stéphane GARNIER pour la qualité de ses cours à l'école de Fougères et ses formations chez ENTENDRE, qui m'ont extrêmement motivé à approfondir mes connaissances sur l'audition.

Merci à Luis GODINHO pour ce fameux stage en 1<sup>ère</sup> année dans son labo qui m'a fait comprendre beaucoup de choses, et toujours le petit mot sympa à chaque fois qu'on se croise en congrès.

Merci à Claudie MARGES, rencontrée lors de mon stage à Paris, toujours de bons conseils, de bonne humeur et aux grandes qualités humaines.

Merci à Xavier HENAFF de m'avoir appris en stage le métier d'audioprothésiste et fait partager sa vision de la prise en charge humaine du malentendant, notamment de l'enfant. Merci d'avoir répondu à mes questions plus farfelues les unes que les autres pendant ce stage.

Merci à Nicolas WALLAERT pour sa vision des choses, son soutien ponctuel mais important à mes yeux ainsi que le développement du site web de l'école de Fougères et son implication dans la recherche et l'amélioration de la prise en charge du malentendant.

Merci à la société ATOL de financer le Contrat de Qualification Professionnel à la CCI de Fougères, excellente formation que j'ai suivie en 2004-2005 avec de très bons intervenants, en particulier Gaspard ATEDZOUÉ. Le contenu des cours m'a été d'une grande aide pour les années qui ont suivies.

Merci à Philippe RENNEVILLE, Sandra COLLAS, Mickael DECOUACON, et Véronique DEMOUCÉL intervenants à l'école Fizeau qui par leurs conseils constructifs m'ont permis d'avancer, de prendre confiance et de me construire.

Merci à l'équipe des centres ENTENDRE de Rennes pour leur compréhension et patience pendant cette longue année et demi où j'ai travaillé en tant qu'audioprothésiste le jour, et la thèse la nuit : Fanny, Sylvaine, Jerome, Ai-Ly, ...

Merci à Mathieu BIGOT & Erwan BIE, master men, pour leur soutien sans faille, leur humour, leurs conseils et tous ces beaux moments partagés, devenus trop rare pendant cette période. Merci à Julianna, la coloc de Mathieu, pour sa gentillesse et les discussions.

Merci à Maxime BALCON, master man, pour son implication dans l'amélioration de la prise en charge du malentendant ainsi que son soutien régulier pendant cette aventure. Merci aussi à Anne GENAIX pour son soutien moral et les retrouvailles régulières en couple pendant ses années en Languedoc.

Merci à Morgan POTIER pour son implication dans l'amélioration de la prise en charge du malentendant, d'avoir été pionnier des étudiants en master audiologie et pour son énergie pour la création de l'association des audiologistes (ARIA).

Merci à mes autres collègues croisés au master, Julien LE CAM, Bertrand PELLAT, Alexandre KARKAS, Benjamin CHAIX, Marie-Aude VESSIGAUD, Maria PERRAULT, Carine BORY, Nicolas VANNSON, Antoine DREUMONT, Alexis BARRAUD, Romy CHAN KWONG,

Camille MACE, Marie DESMIER, Elsa LEGRIS, Nathan LE CAM, Thibaut WISNIEWSKI, Charlotte DIJOURD, Johann LAHAI, Anaïs ETOURNEUX, Thomas JUSTAL, Alice LAMY, Antoine GENSTY et Madona AL ZAKHEM pour leur soutien, leur compréhension ou/et les bons moments partagés durant ces années sur Montpellier.

Merci à Jean-Christophe LUCO, LA personne qui m'a vu évoluer et grandir durant ces 6 années à Fougères, pour tes mots toujours sympas et nos rencontres sur Paris.

Merci à Christian NGUYEN pour son optimisme, son humour et le mot toujours sympa à chaque fois qu'on se croise.

Merci à Pierre SOBECK pour son humour et les bonnes soirées à Fougères (Team America !).

Merci à ma promo d'audio à Fougères pour tous les bons moments passés à cette période (la fameuse promo 10) et les mots sympas à chaque fois que l'on se recroise en congrès : Matthieu, Mathilde, Gautier, Luc, Benjamin, Léa, Jean-René, Caroline, Thomas, Germain, Aurélien, Marie, Maud, Amandine, ...

Merci à Anne-Claire BRISORGUEIL, CQPgirl, pour son soutien et toutes les soirées à Fougères, Redon et Rennes ainsi que les discussions au téléphone pendant mon séjour Montpellierain.

Merci à ceux croisés à Fizeau et sur Fougères, Damien (« man bites dog »), Mickael (Astroman), Jaff (la jamnese), Louis, (« c'est bon, on est LAARRRGE »), Francois, bubu, Edo, Estelle, Régis (« en son temps ! ») pour leur humour et toutes ses bonnes soirées passées ensemble sur Fougères.

Merci à Éric LE CHAPPELLIER pour son humour, sa vision du monde et tous ces beaux moments passés ensemble à Fougères.

Un grand merci à Alain TRELUYER pour son soutien sans faille, son attitude positive, ses conseils, sa compréhension, d'avoir toujours été présent et à l'écoute ainsi que pour les nombreux hébergements à l'œil dans son petit appart parisien et ce durant toute cette longue aventure montpelliéraine.

Un grand merci également à Erwan DEMILLAC pour son immense soutien humain indéfectible, ses conseils, sa compréhension, son aide que ce soit pour l'écoute ou la logistique notamment depuis notre retour en Bretagne.

Merci à Hervé et Céline LEMOIGNE pour leur soutien, leur compréhension et nos retrouvailles régulières toujours agréables sur Montpellier ou Toulouse.

Merci à Bernard OLERON, Mehdi HACHED (« At The Gates »), Loïc MARTIN (George Abitbol) et Yoan NOGUES, anciens collègues de fac de Maths, pour leur humour, les encouragements, conseils et le bonheur à chacune de nos retrouvailles.

Merci à Emmanuel PERRAULT pour sa vision du monde, sa culture, son humour et toutes ses bonnes soirées qu'on a partagées.



Merci à Thomas MILLET pour ses heures partagées au lycée ou au Handball, ses conseils sur les méthodes de travail et la vision des choses qui m'ont, bien des années plus tard, grandement aidé.

Merci à Hervé LECHIEN pour son humour, ses conseils pour la rédaction, ses multiples initiatives en tout genre et son enthousiasme permanent.

Merci à Tristan ISRAEL pour son humour, sa bonne humeur, son talent footballistique de légende, pour les soirées, pour le séjour inoubliable passée en Grèce et d'avoir été mon idole de jeunesse.

Merci à Juliette GUERALT, ancienne collègue de fac, ainsi qu'à Benoit LE RHUN pour leur soutien, leur humour, leurs conseils et les rencontres toujours agréables.

Merci à Caroline et Sylvain, Marie et Thibaud, Ines et Thomas, Charlotte et Julien, Pauline et Nico, Anna et Eyméric, Isabelle et Christophe, Claire et Nicolas, Fanny et Guillaume pour les rencontres toujours agréables durant ces années Montpelliéraines.

Merci Terry GILLIAM pour L'armée des douze singes (1995) et à Coline SERREAU pour les films La crise (1992) et Chaos (2001).

Merci aux frères COLLYER, Paul et Oliver, pour les CHAMPIONSHIP MANAGER des années 90 et à Sid MEIER pour CIVILIZATION, qui m'ont instruit dans la stratégie à long terme.

Merci à Stéphane PICQ pour les musiques (sur carte AdLib) des jeux DUNE et KGB, développés par Cryo Interactive.

Merci à Bernard WERBER pour les livres L'empire des anges et Le livre du voyage.

Merci à mon oncle Michel pour son écoute, son soutien, le partage de son expérience et ses conseils notamment dans la dernière ligne droite de cette aventure montpelliéraine. Merci également à Andrée pour les rares fois où l'on s'est croisé pour ces mots gentils et compréhensifs.

Merci à mon oncle Richard pour ses mots toujours sympa à chaque fois que l'on se croisait ainsi que son aide logistique, ses conseils et la répétition dans la voiture le jour de la demande de financement à ENTENDRE en décembre 2011.

Merci à mon cousin Antoine pour les passionnantes discussions que ce soit à Paussan ou au téléphone depuis mes 18 ans, en particulier sa vision du monde qui m'a aidé à me construire.

Merci à mes parents d'avoir fourni le terreau pour permettre cette aventure, leur éducation, leur vision du monde, leur souplesse, leur soutien indéfectible affectif, pratique mais aussi financier, ne le cachons pas, notamment depuis un an et demi et notre retour en Bretagne. Merci pour tous ces beaux moments partagés depuis toujours.

Merci à mes grand-parents pour leur vision du monde qui m'ont aidé à me construire et tous ces beaux moments partagés.

Merci à ma belle-famille, Françoise et Gérard, qui ont été remarquable de soutien que ce soit moral, ou logistique (merci pour le puits Jacob et les gardes d'enfants !). Bref un infini merci à eux.

Merci à la marraine de monsieur Tic, Adeline, pour son soutien moral et toute l'aide humaine qu'elle a pu apporter.

Merci à David, cousin de ma compagne, pour son écoute et ses conseils, notamment dans la dernière ligne droite de la thèse.

Merci à Nicolas, cousin de ma compagne, pour les discussions toujours pertinentes et sa culture.

Merci à Maryse et Bernard pour le soutien et toute l'aide logistique et humaine, notamment depuis notre retour à Rennes.

Merci à mes frères, Vianney et Nicolas, pour les échanges qui m'ont permis de me construire, leurs conseils et leur soutien pendant ce long voyage initiatique.

Un infini merci enfin à ma compagne, Elodie, de m'avoir toujours soutenu, compris, conseillé, aidé, d'avoir pris sur elle, d'avoir patienté durant ces nombreuses années (enfin ça se termine !). Merci pour son courage, sa stabilité, son honnêteté et sa raison. Merci à monsieur Loustic, 5 ans et demi, pour sa joie, ses jeux, ses nombreux dessins et bisous pour me donner de l'énergie pour travailler et d'avoir compris qu'il fallait laisser papa travailler sur son ordinateur. Merci à la petite princesse, pour le bonheur qu'elle a provoquée par son arrivée dans la famille quelques mois avant la soutenance.

Bref, merci à tous et ceux que j'oublie...

## Résumé

**Contexte** : La compréhension de la parole dans le silence est dépendante des mécanismes de codage de l'enveloppe temporelle du signal sonore. Une anomalie du codage (d'origine infectieuse, immunitaire, génétique, tumorale, ou environnementale) entraîne irrémédiablement une diminution des performances audiométriques vocales. Les méthodes d'exploration fonctionnelle de la cochlée (potentiels d'action composite du nerf auditif, potentiel évoqués auditifs précoces) utilisent des *stimuli* sonores simples (clics, bouffées tonales) pour détecter une anomalie de codage des indices temporels. Le but de cette étude était de développer une méthode électrophysiologique capable de mesurer les réponses du nerf auditif à des *stimuli* modulés en amplitude.

**Matériel et méthodes** : La réponse électrophysiologique du nerf auditif a été mesurée à l'aide d'une électrode placée sur la niche de la fenêtre ronde de la cochlée de gerbilles et de rats vieillissants. Les *stimuli* acoustiques consistaient en des bandes de bruit de 20 secondes modulées sinusoïdalement en amplitude et centrées sur 4, 8 et 16 kHz. Nous avons étudié le niveau, la profondeur de modulation, la fréquence de modulation et la fréquence porteuse.

**Résultats** : Notre étude sur le modèle de perte sélective neuronale (ouabain) montre que l'analyse des potentiels globaux cochléaires permet de détecter une perte de fibres à basse activité spontanée dans le nerf auditif, résultat important car indétectable (« surdités cachées ») actuellement avec les tests utilisés en routine en clinique (EcoG et PEA) (Batrel, Huet, Hasselmann *et al*, Plos One 2017). Ensuite, en combinant le stimulus de cette étude avec une fonction sinusoïdale, nous avons développé et validé une méthode pour évaluer la qualité de codage de l'enveloppe par le nerf auditif. Nous avons appliqué cette méthode sur un modèle de vieillissement (rat Sprague-Dawley). Nos résultats suggèrent que le vieillissement entraîne une modification du phénotype des fibres du nerf auditif sans pertes de fibres associées (article Occelli, Hasselmann *et al*, soumis à eNeuro).

**Conclusion** : Notre travail démontre qu'il est indispensable d'élargir le nombre de techniques d'exploration fonctionnelle de la cochlée car les tests utilisés en routine en clinique ne permettent pas de déceler des déficits subtils d'encodage dans le nerf auditif. La mesure de l'activité soutenue des fibres permet de détecter la perte sélective des neurones à basse activité spontanée, indétectable avec les méthodes classiques. Le changement de phénotype des fibres observé au cours du vieillissement du rat Sprague-Dawley est détectable avec notre méthode alors qu'il ne l'est pas avec le potentiel d'action composite du nerf auditif.

**Mots clés** : Enveloppe temporelle, fibres du nerf auditif, modulation d'amplitude

## Summary

**Background**: Speech intelligibility in quiet is critically dependent on the temporal envelope of a sound signal. An abnormal coding of this temporal cue (due to infectious, immune, genetic, tumoral or environmental of origin) implies a decrease of speech recognition scores. The current proxy to probe deafness in clinical framework (Compound Action Potential of the auditory nerve, auditory brainstem responses) uses simplistic stimuli (clicks, tone bursts) to detect a such abnormal coding of the temporal cues. The aim of this study was to develop a new electrophysiology method in murins able to measure the auditory nerve responses to amplitude-modulation stimuli.

**Material and methods**: The electrophysiology response of the auditory nerve was recorded using an electrode implanted onto the round window niche on normal-hearing gerbil cochlea and aging rat cochlea. The acoustical stimuli consisted of 20 seconds sinusoidally amplitude-modulated noise-band centered on 4, 8 and 16 kHz. We have studied varying sound level, the modulation depth, the modulation frequency and the carrier frequency.

**Results**: Our study on the selective fiber loss ouabain model show the mass potentials recorded at the round window enable the detection of low spontaneous rate fibers in gerbil auditory nerve. This result is important because the current clinical used tests aren't enough sensitive to detect a such coding impairment (CAP, ABR) (Batrel, Huet, Hasselmann *et al.*, 2017). Then we combined the stimulus of this previous study with a sinusoidal function to develop a new method to assess the envelope coding by the auditory nerve. We validated this new method. Last, we used our method on an aging model (Sprague-Dawley rat). Our results suggest aging leads to a phenotype change of auditory nerve fibers without associated fiber loss (article Occelli, Hasselmann *et al*, submitted to eNeuro).

**Conclusion**: Our study shows it's indispensable to expand the number of tools to probe the cochlea because the current clinical used tests aren't enough sensitive to detect subtle deficits of encoding in the auditory nerve. The recording of the fiber sustained activity enables to detect the selective loss of low-spontaneous rate neurons. A such loss is undetectable with classical clinical tools. The phenotype change of fibers we observed in aging Sprague-Dawley rats is detectable with our method whereas it's not using the compound action potential of the auditory nerve.

**Key words**: Temporal Envelope, Auditory Nerve Fibers, Amplitude Modulation.