



HAL
open science

Empreinte développementale des cellules sensorielles auditives

Anne-Gabrielle Harrus

► **To cite this version:**

Anne-Gabrielle Harrus. Empreinte développementale des cellules sensorielles auditives. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTT087 . tel-02053416

HAL Id: tel-02053416

<https://theses.hal.science/tel-02053416v1>

Submitted on 1 Mar 2019

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

Unité de recherche INSERM U1051 - Institut des Neurosciences de Montpellier

Empreinte développementale des cellules sensorielles auditives

Présentée par Anne-Gabrielle Harrus

Le 30 novembre 2018

Sous la direction du Dr Régis Nouvian

Devant le jury composé de

Brigitte Malgrange, Professeure, Université Liège

Ana-Maria Gomez, Directrice de recherche, Université Paris-Sud, Inserm

Jean-Luc PUEL, Professeur, Université Montpellier

Régis NOUVIAN, Directeur de recherche, Cnrs

Rapporteur

Rapporteur

Président du jury

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Et voilà c'est l'heure du bilan... C'est en regardant en arrière que l'on se rend compte à quel point le temps passe vite !!

J'aimerais tout d'abord remercier **Jean-Luc Puel** qui m'a accueillie au sein de son laboratoire pour réaliser mon master 1 mais surtout ma thèse. Et merci aussi de toujours avoir eu ces petites remarques sympathiques et cette constante bonne humeur.

Bien sûr, merci à **Régis**. Tu es quelqu'un de profondément humain et gentil. Cela a été un réel plaisir de travailler à tes côtés. Merci pour tout le temps que tu m'as consacré même quand tu étais submergé de travail. Tu as toujours eu les mots pour me remonter le moral ou me motiver même quand pour moi ce n'était pas facile. Tu m'as apporté énormément tant sur le plan scientifique (bien évidemment) que sur le plan personnel.

Jean-Charles, sans toi il n'y aurait rien eu (ou presque) à tirer de cette thèse, merci pour le nombre incalculable d'heures passer à refaire ces graphs à chaque fois ! Merci, pour ces discussions en tout genre (films, chats, jeux, et j'en passe) lors des repas le midi.

Une vive pensée aux autres membres de l'équipe 02, **Jing, Jérôme, Maria, Michel, Artem, Yuvraj** et qui ont toujours été là et qui n'ont jamais été avares de conseils et de motivation. Merci plus particulièrement à **Florence**, qui ne loupe jamais une occasion de penser à moi (un petit mot, une petite gourmandise) et à **Gilles** qui, tous les matins, me faisait remarquer que je n'étais pas très bien réveillée. Je n'oublierai pas **Marie** et **Gaston**, merci à tous les deux de m'avoir accueillie dans l'équipe et de m'avoir ouvert la voie au patch et à l'imagerie.

Merci à **Chantal Cazevielle** et **Rémy Pujol** pour toutes les heures et le travail que vous m'avez consacrés au sein de la plateforme de microscopie électronique. Merci à Chantal d'être restée aussi calme malgré le fait que je sois un satané chat noir, et merci à Rémy d'avoir partagé avec moi un bout de son puits sans fond de connaissances et de gentillesse.

Flora, Chris, Laura et toute l'équipe animalerie... Que dire !! **Chris** tu vas me manquer (t'emballer pas trop quand même), **Flora** heureusement que tu étais là dès le début, merci de m'avoir prise par la main et de m'avoir tant appris. Merci pour ton franc parler et ton énergie débordante. Vous m'avez tous beaucoup fait rire et permis de passer des moments au labo où je ne pensais pas au labo !!

Martine, je tenais à te remercier pour ton oreille toujours attentive, nos discussions toutous et compagnie, et surtout d'avoir rendu mes matins un peu moins douloureux ! **Chloé, Jérémy**, merci pour toutes ces petites discussions

autour d'un café, d'une commande ou d'une pause, qui sont bien plus importantes que ce vous ne pouvez penser.

Emilie Brun, je crois que tout simplement je vais te dire merci d'avoir été là. Je pense que sans toi cette aventure aurait été un peu plus dure à affronter. **Alicia**, *guapa*, ta bonne humeur constante était un régal pour les oreilles et pour le moral. **Patrice**, même comme ça je ne sais pas si je pourrais exprimer tout ce que tu m'as apporté, personnellement, professionnellement. Je crois que tu m'as montré qu'on pouvait tenir le cap malgré tout ce qui arrivait. Et puis sans toi, à tous les coups, j'aurais commencé cette thèse par les perspectives, hein ! **Caco**, je crois que j'ai réussi à soutenir ma thèse avant toi, en espérant que tu arrives quand même à la soutenir avant 2020, ça serait pas mal ! Merci de m'avoir autant fait rire durant ces 3 années. **Corentin**, merci d'avoir été toi tout simplement, d'être quelqu'un sur qui on peut compter. **Charlène "Roukmouf"**, ça fait bizarre de trouver quelqu'un qui me ressemble sur autant de points, ça ferait presque peur. **Ashley "Cheesecake"**, ta gentillesse et ton côté "économe" je m'en souviendrai toujours je crois ! En tout cas merci à **vous 8** de m'avoir "forcée" à sortir et à casser mon rythme de mamie pour passer ces moments géniaux avec vous dans les bars, les restos etc... Pensée pour ce foutu bocal dans le bureau de Corentin qui ne m'a certainement pas aidé à garder mon poids de forme !

Chloé, grâce à toi je suis maintenant convaincue que tous les stagiaires ne sont pas forcément des tire-au-flanc. Des personnes comme toi, gentille, motivée et organisée j'en veux autour de moi tous les jours ! Bien évidemment il en va de même pour **Razane** et **Marjorie**.

Hélène B., Benoit G., Sophie G. et Nicolas L. merci pour les conseils ou tout simplement les échanges au détour d'une manip, d'un café ou d'une cigarette.

Salim, Claire, ça été un plaisir de vous côtoyer pendant ces 3 années de plus, j'ai appris à vous découvrir bien mieux qu'avant et ça a été une vraie joie de vous croiser tous les jours au labo, avec juste un échange de sourire ou bien des conversations un peu plus longues au détour d'un trajet en voiture, de balade dans Bordeaux ou d'un café.

Emilie "mamie fenouil", ma pauvre, tu m'as supportée trois loooongues années de plus, trois longues années de plus à m'épauler, à supporter mes plaintes, mes coups de sang, mes coups de cafard, mes moments de folie. Mais trois longues années où tu m'as démontré que malgré les coups de Trafalgar divers et variés, quand on est déterminée comme tu l'es, rien n'est impossible.

Laeti, durant ces trois années tu as été un exemple pour moi de droiture, de motivation et de dépassement de soi. Tu m'as poussée vers mieux, juste en étant toi et en surmontant tes épreuves sans ciller et sans jamais abandonner.

Ah, et merci de m'avoir permis d'adopter ce petit chaton d'amour. **Zazou** et **Alexe**, qui ont été des copines en or toujours présentes quand j'avais un coup de mou (et même quand ça allait bien en fait), et **Meringue** qui a un don fabuleux pour placer ce petit mot acide qui remet le sourire immédiatement en place !

Kev & Sia, Val, Linda & Bobo, Jessie, JC & Léa, Anto, Climoune & Angie merci à vous tous pour tous ces moments off-thèse, pour tous ces repas, pour toutes ces heures de jeu et de partage qui m'ont permis de me sortir l'esprit du taff et d'y retourner un peu plus motivée. Kev j'espère que tu finiras par gagner à l'euro million.

Odile & Joel, Zoé, je tenais à vous remercier pour ces week-end reposants et revitalisants, à force de siestes, de conversations qui n'en finissent pas et de moments "beauté".

Brett, mon chaton alpha, sans toi je crois que j'aurais eu à peu près 28 ulcères de plus. Durant ces trois années tu m'as fait grandir et relativiser sur tout ce qui se passait au labo et même en dehors. Tu m'as forcé un nombre incalculable de fois à lâcher prise et c'était nécessaire. Sans ta présence à mes côtés, je ne suis pas sûre que j'aurais réussi à finir cette épreuve. Merci pour tout ça et désolée pour les (nombreux) moments où j'ai été insupportable.

Et enfin, un immense merci à mon **papa** et à ma **maman**, sans qui je n'aurais jamais pu en arriver là. Ils ont toujours été force de compassion, de motivation et de remise en question. Merci de m'avoir toujours soutenue et de toujours avoir été là quand j'en avais besoin. Merci de leur implication, et de m'avoir poussée à donner le meilleur de moi-même durant ces 28 dernières années. Merci maman pour tous ces bons petits plats et merci papa d'avoir passé trois heures à corriger toutes les fautes.

Résumé

Les cellules ciliées internes (CCI) sont les cellules sensorielles de l'organe de l'audition, elles transforment les ondes sonores en messages nerveux. Avant l'entrée en fonction de la cochlée, les CCI émettent spontanément des potentiels d'action (PA) calciques, ce qui active la voie auditive ascendante et assure le développement de l'axe tonotopique, à savoir la représentation du codage en fréquence, dans chaque relais de la voie auditive. Le profil et les mécanismes à l'origine des PA des CCI sont fortement débattus. Nous nous sommes donc attachés à étudier l'empreinte développementale des cellules sensorielles, c'est à dire déterminer le profil et les mécanismes à l'origine de leur activité.

Après avoir incubé l'épithélium neuro-sensoriel avec la sonde calcique Fura2-AM, nous avons observé des vagues calciques se propageant le long des cellules de soutien et des cellules sensorielles. Plus précisément, l'activité des cellules ciliées se caractérisait par des élévations transitoires de calcium (pics calciques) à intervalles de temps réguliers. Nous avons ensuite démontré que les pics calciques des CCI correspondaient bien à des bouffées de PA en mesurant simultanément les oscillations calciques et l'émission de PA en patch-clamp. La fréquence, la durée et la distribution temporelle des pics calciques des CCI étaient en grande partie invariantes le long de l'axe base-apex de la cochlée. Enfin, les cellules voisines montraient une activité fortement synchrone à l'inverse des cellules spatialement éloignées. Ces résultats indiquent donc que l'activité des CCI est majoritairement identique le long de l'axe tonotopique de la cochlée.

Nous nous sommes ensuite intéressés au mécanisme responsable de l'activité spontanée, la dépendance à l'ATP. L'incubation d'apyrase, une ecto-nucléotidase, entraîne une diminution de l'activité des cellules de soutien, à savoir une réduction de l'aire et de la vitesse de propagation des vagues calciques. En revanche, l'activité des CCI n'est pas altérée par la déplétion d'ATP. Ces résultats suggèrent 2 mécanismes distincts, le premier ATP-dépendant et le second ATP-indépendant dans les cellules de soutien et sensorielles, respectivement.

L'ensemble de ces résultats indique que la maturation des centres supérieurs serait déterminée par l'activation synchrone d'un nombre limité de cellules sensorielles.

Mots-clefs : Cochlée, Potentiels d'action, Transitoires calciques, Ecto-nucléotidase

Abstract

During development, the sensory cells of the cochlea, the inner hair cells (IHCs), fire spontaneous calcium action potentials. This spontaneous spiking activity at the pre-hearing stage allows the IHCs to automatically stimulate the auditory nerve fibers and hence, ensures the proper shaping of the tonotopic organization along the ascending auditory pathway. Spontaneous spiking patterns may depend on the IHCs position on the cochlea (the tonotopic axis). Those patterns may also rely on ATP secretion from neighboring supporting cells. In this study, we used calcium imaging in the immature neuro-sensory epithelium of the cochlea, the Kölliker's organ, to gain insights in the IHCs spiking activity. After loading the Kölliker's organ with the calcium dye fura-2 AM, propagation of spontaneous calcium waves was readily observed across supporting and sensory cells. Both basal and apical IHCs were characterized by similar spontaneous calcium transients interspaced with silent periods, reminiscent of bursts of action potential recorded in patch-clamp. In addition, neighboring cells show a strong degree of synchronous activity. Incubation with apyrase, which hydrolyzes ATP, prevents the spontaneous calcium increase that propagates across the supporting cells within the Kölliker's organ. However, it leaves the spontaneous calcium transients in IHCs mostly unaffected. All these results show that the tonotopic map refinement in higher auditory centers comes from a coordinated activity of neighboring sensory cells, whose activity seems to be independent of ATP.

Keywords: Cochlea, Action potential, Calcium transients, Ectonucleotidase

Table des matières

Abréviations	8
Introduction.....	9
Maturation cochléaire.....	12
2.1. L'organe de Kölliker	13
2.1.1. Anatomie de l'organe de Kölliker	13
2.1.1.1. Structure des cellules de soutien de l'organe de Kölliker	14
2.1.1.2. De l'organe de Kölliker au sulcus interne.....	15
2.1.2. Activité de l'organe de Kölliker	17
2.1.2.1. Activité électrique des cellules de soutien.....	17
2.1.2.2. Activité calcique des cellules de soutien.....	18
2.1.2.3. Mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire et libération de KCl.....	19
2.2. Les cellules ciliées.....	20
2.2.1. Anatomie des cellules ciliées immatures	20
2.2.1.1. Développement de la touffe ciliaire.....	20
2.2.1.2. Développement des synapses.....	22
2.2.2. Activité électrique des cellules ciliées internes immatures	23
2.2.2.1. Canaux et récepteurs ioniques.....	24
2.2.2.1.1. Courant mécano-transducteur, I_{MET}	24
2.2.2.1.2. Conductances ioniques sensibles au potentiel, $I_{Ca^{2+}}$, I_{K^+} et I_{Na^+}	25
2.2.2.1.3. Récepteur nicotinique et canal potassique SK2.....	28
2.2.2.2. Potentiels d'action et maturation synaptique des CCI.....	28
2.2.2.3. Potentiels d'action et activation de la voie auditive	30
2.2.2.4. Profil des potentiels d'action le long du gradient base-apex.....	31
2.2.2.5. Mécanismes à l'origine des potentiels d'action.....	33
2.2.2.6. Modulation de l'activité des CCI immatures	35
2.3. L'innervation au cours du développement	36
2.3.1. Innervation afférente	36
2.3.2. Innervation efférente	37
Matériel et méthodes.....	39
3.1. Mesure de l'activité électrique et calcique	40
3.1.1. Préparation de l'explant de l'organe de Corti	40
3.1.2. Enregistrement des potentiels d'action	40
3.1.3. Enregistrement des variations calciques intracellulaires.....	42
3.1.4. Mesure de l'activité calcique.....	43

3.1.5. Mesure de la sensibilité à l'ATP.....	45
3.2. Analyses et statistiques	46
Résultats.....	48
4.1. Développement de la méthode d'exploration fonctionnelle.....	49
4.2. Variations du calcium intracellulaire et potentiel d'action	50
4.3. Profil d'activité des cellules ciliées internes	52
4.4. Activité synchrone des cellules ciliées internes adjacentes.....	55
4.5. Activité synchrone des cellules ciliées et cellules de soutien	56
4.6. Rôle des cellules de soutien phalangiennes.....	60
4.7. Activité calcique dépendante de l'ATP.....	63
4.8. Activité calcique indépendante de l'ATP.....	65
Discussion & Perspectives	69
5.1. Les élévations calciques transitoires des cellules ciliées internes : miroir des trains de potentiels d'action.....	70
5.2. Le profil d'activité des CCI le long du gradient base-apex.....	72
5.3. Activité des CCI et ATP	73
5.4. Perspectives.....	75
Références.....	77
Article	85

Abréviations

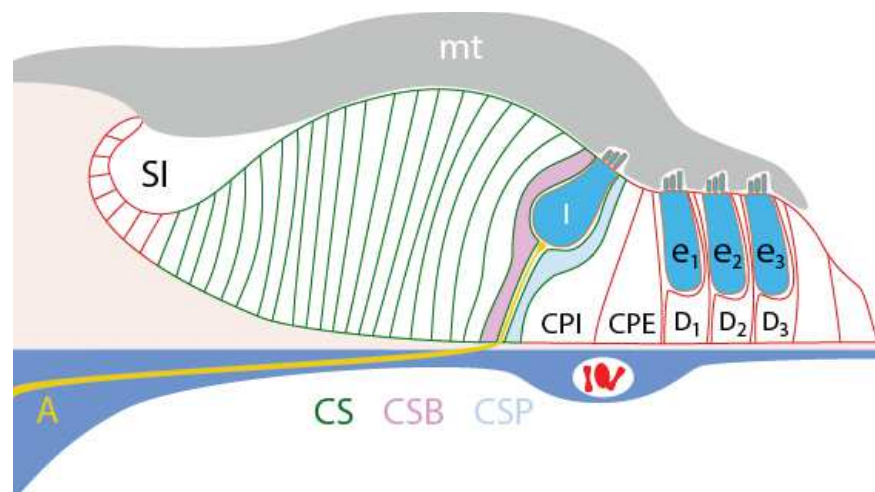
-AM	Groupement acétoxyméthyle
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
ANO1	Anoctamine-1 (cf TMEM16A)
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BK	Canaux potassiques de grande conductance sensible au calcium
CaCl₂	Chlorure de calcium
CCE	Cellules ciliées externes
CCI	Cellules ciliées internes
CNQX	Cyanquixaline (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione)
CPI	Cellules phalangiennes internes
CPP	Acide 3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonique
CV	Coefficient de variation
Cx	Connexines
EX	X ^{ème} jour embryonnaire
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
I_{inj}	Courant injecté
IP3	Inositol Tri-Phosphate
IS	Index de synchronisation
ISx ou Slx	Valeur de l'IS à x μ m
I_x	Courant X
KCl	Chlorure de potassium
K_d	Constante de dissociation
KOH	Hydroxide de Potassium
MgCl₂-6H₂O	Magnésium chloride hexahydrate
MgSO₄-7H₂O	Magnésium sulfate heptahydrate
MOC	Faisceau olivo-cochléaire médian
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxide de sodium
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
PA	Potentiels d'action
PPADS	Acide Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonique sel de tetrasodium
PTU	Propyl-thio-uracil
PX	X ^{ème} jour post-natal
R	Ratio de fluorescence
R₀	Niveau basal du ratio de fluorescence
ROI	Régions d'intérêt
SG	Semaine(s) de gestation
SK2	Canaux potassiques de petite conductance de type2
TMEM16A	Membre transmembranaire16A
TTX	Térodotoxine
T4	Thyroxine
V_m	Potentiel de membrane
[Ca²⁺]_i	Concentration de calcium intracellulaire
ΔR	Variation du ratio de fluorescence

Introduction

Les cellules ciliées internes (CCI) sont les cellules sensorielles de l'organe de l'audition. Chez l'adulte, elles transforment les ondes sonores en messages nerveux interprétables par le cerveau (Nouvian *et al.*, 2006). Au cours du développement, le transfert de l'information sonore est impossible en raison de l'immaturation anato-fonctionnelle de l'oreille, avec notamment la fermeture du conduit auditif externe et l'absence d'endolymphe (Anniko *et al.*, 1979; Saunders *et al.*, 1993). Cependant, les CCI émettent spontanément des potentiels d'action calciques jusqu'à l'entrée en fonction de la cochlée (12 jours après la naissance chez la souris et 4 mois et demi *in utero* chez l'Homme; Kros *et al.*, 1998; Marcotti, 2012; Sendin *et al.*, 2014). A chaque potentiel d'action est associée une libération du neuromédiateur des cellules ciliées internes, le glutamate (Beutner and Moser, 2001; Marcotti *et al.*, 2003b; Tritsch *et al.*, 2010). L'activité électrique des CCI permet donc d'activer la voie auditive ascendante sans stimulation acoustique afin d'organiser l'axe tonotopique au niveau des centres auditifs supérieurs, c'est à dire la représentation du codage en fréquence dans chaque relais de la voie auditive (Babola *et al.*, 2018; Clause *et al.*, 2014; 2017; Sun *et al.*, 2018; Tritsch *et al.*, 2010).

Figure 1 : Représentation schématique de l'organe de Corti au cours du développement.

Les cellules de soutien (CS, en vert) formant l'organe de Kölliker se caractérisent par une activité autonome



intense, dictant l'activité des cellules ciliées internes (I) et des fibres du nerf auditif (A). SI : sulcus interne, Mt : membrane tectoriale, e : cellule ciliée externe, D : cellules de Deiters, CPI : cellule du pilier interne, CPE : cellule du pilier externe, CSP : cellules de soutien phalangiennes, CSB : cellule de bord.

Adapté de Tritsch *et al.*, 2007.

Le profil de l'activité spontanée des CCI est controversé. En effet, il a été proposé que l'activité des CCI immatures variait le long de la cochlée avec une activité soutenue à la base de la cochlée et en bouffée à la partie apicale (Johnson *et al.*, 2011). Dans ce modèle, les centres supérieurs recevant des entrées continues ou bien interrompues se spécialiseraient, respectivement, pour coder des fréquences aiguës et graves après l'entrée en fonction de la cochlée. Une autre étude propose une activité dont le profil, à savoir des trains de potentiels d'action en bouffée, est homogène le long du gradient-base-apex (Sendin *et al.*, 2014). Dans ce modèle, l'organisation au niveau des centres supérieurs dépendrait plutôt de l'activité synchrone d'un nombre limité de cellules ciliées adjacentes.

De plus les mécanismes sous-jacents à l'émission de ces potentiels d'action par les CCI sont eux aussi fortement débattus. La propagation d'une vague d'ATP au travers des cellules de soutien de l'organe de Kölliker pourrait activer les CCI et initier ainsi l'émission des potentiels d'action (Tritsch *et al.*, 2007). Dans ce modèle, l'ATP a une action excitatrice. A l'inverse, une action inhibitrice de l'ATP sur les CCI a été observée (Johnson *et al.*, 2011). Ici encore, ces données sont contradictoires avec une activité électrique insensible aux antagonistes purinergiques (Sendin *et al.*, 2014). Enfin, l'activité des CCI semble être dépendante à l'acétylcholine contenue dans les terminaisons des fibres efférentes qui innervent transitoirement les CCI immatures (Johnson *et al.*, 2011; Sendin *et al.*, 2014). L'objectif de cette thèse a été de déterminer le profil et le mécanisme d'action à l'origine de l'émission des potentiels d'action des CCI, notamment la sensibilité à l'ATP. Pour ce faire, nous avons mis en place une méthode d'exploration fonctionnelle des CCI immatures ainsi que des cellules de soutien de l'organe de Kölliker. Nos résultats suggèrent un profil d'activité des CCI immatures similaire le long de l'axe tonotopique et semblant être indépendant de l'ATP.

Maturation cochléaire

L'organe de l'audition périphérique, la cochlée se développe à partir de la placode otique (Rubel and Fay, 2012). Chez la souris, l'épithélium qui donnera naissance aux cellules sensorielles et aux cellules de soutien, se distingue à partir de 14.5 jours *in utero* (E14.5) ce qui correspond aux mitoses terminales des CCI tandis que chez l'homme, l'épithélium est présent à partir de la 9^{ème} à 10^{ème} semaine de gestation. A ce stade, on observe un épithélium polystratifié non différencié avec la présence de microvillosités et de kinocils projetant vers le lumen. Cependant, les fibres nerveuses qui innervent les cellules ciliées sont déjà présentes au sein de cet épithélium. A partir de E16 chez la souris, l'épithélium neuro-sensoriel peut se distinguer selon deux régions spatialement distinctes : la grande crête épithéliale et la petite crête épithéliale (Lim and Anniko, 1985). La grande crête épithéliale regroupe les cellules de soutien internes et les cellules de soutien de bord et phalangiennes, qui entourent les cellules ciliées internes. Les cellules de bord se situent vers le modiolus tandis que les cellules phalangiennes se situent du côté du pilier. La petite crête épithéliale est composée des cellules de soutien associées aux cellules ciliées externes et aux autres cellules de soutien qui donneront naissance en grande partie au sulcus externe à l'état adulte. Les cellules des piliers internes et externes, qui entoureront plus tard le tunnel de Corti, séparent les deux crêtes épithéliales. Jusqu'à l'entrée en fonction de la cochlée, soit 2 semaines après la naissance chez la souris et 4^{1/2} mois *in utero* chez l'homme, la morphologie de la cochlée va progressivement se transformer, notamment avec l'innervation et la différenciation des cellules sensorielles et la mise en place des différents compartiments cochléaires (Rubel and Fay, 2012).

2.1. L'organe de Kölliker

2.1.1. Anatomie de l'organe de Kölliker

Décrit en 1863 par Albert Von Kölliker, l'organe de Kölliker est associé à l'épithélium sensoriel de la cochlée au cours du développement (Kölliker, 1863 ; Hensen, 1863). Plus

précisément, cet épithélium correspond à l'assemblage de cellules de soutien présentes avant l'entrée en fonction de la cochlée et qui donnera naissance au sulcus interne de l'épithélium neuro-sensoriel adulte de la cochlée (organe de Corti, **Fig 2.1**). L'organe de Kölliker a été observé chez différentes espèces, incluant le chat, lapin, chien, rongeurs et l'Homme. En raison de la nature transitoire de l'organe de Kölliker, (il disparaît lors de l'entrée en fonction de la cochlée), un remodelage cellulaire intense a donc lieu au sein de la cochlée au cours du développement.

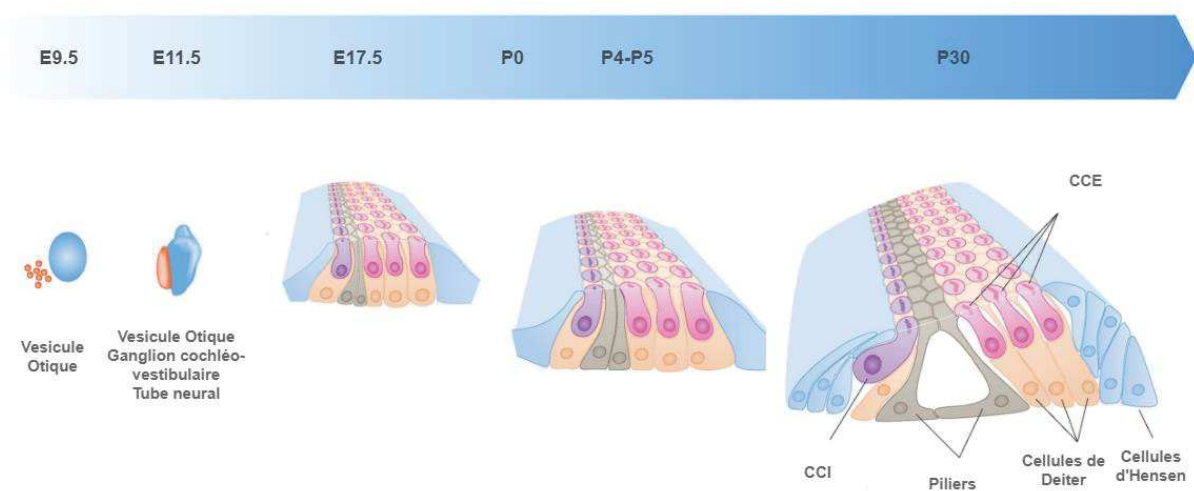


Figure 2.1 : Évolution des structures de l'organe de Corti au cours du développement. La vésicule otique, présente à E9.5, va évoluer pour donner lieu au ganglion vestibulo-cochléaire et au tube neural à E11.5. A E17.5, les deux types de cellules sensorielles ainsi que les différentes cellules de soutien sont présentes. A partir de P4-P5 on assiste à un élargissement de l'organe de Corti jusqu'à l'obtention d'un épithélium neuro-sensoriel mature. Adapté de [Rudnicki and Avraham, 2012](#).

2.1.1.1. Structure des cellules de soutien de l'organe de Kölliker

Les cellules de soutien de l'organe de Kölliker ont une forme en colonne avec une longueur d'environ 65 μm et une largeur d'environ 5 μm chez le chat. Leur noyau est le plus souvent situé dans la partie basale (**Fig 2.2**). Des microvillosités, dont la longueur est de 3 à 4 μm sont présentes à leur surface apicale jusqu'à environ une dizaine de jours après la naissance.

Le cytoplasme des cellules de soutien est dense avec de nombreux organites tels que des mitochondries et des vésicules sécrétrices. En raison de leurs microvillosités, de leur localisation à proximité du futur sulcus interne et de l'apposition de la membrane tectoriale sur l'organe du Kölliker, il a été proposé que les cellules de soutien seraient responsables de la formation de la membrane tectoriale. Au niveau moléculaire, on note l'expression de protéine d'adhésion comme la N-cadhérine, en accord avec la nature dense de l'organe de Kölliker (Simonneau *et al.*, 2003). De plus, les cellules de soutien expriment abondamment des jonctions communicantes (gap-jonctions) composées par les connexines 26 et 30 (Cx26 et Cx30) (Lautermann *et al.*, 1999; Ortolano *et al.*, 2008), ce qui suppose un transfert important de seconds messagers.

2.1.1.2. De l'organe de Kölliker au sulcus interne

Lors de la maturation de la cochlée, les cellules colonnaires sont progressivement remplacées par des cellules de forme cubique, d'environ 10 µm de longueur, qui formeront le sulcus interne. Le remplacement des cellules de soutien par celles du sulcus interne suit le gradient base-apex de la cochlée. Le mécanisme sous-jacent à la transformation des cellules de soutien en cellules du sulcus interne reste en grande partie inconnue. Une première phase pourrait impliquer une apoptose des cellules suivie par la transformation des cellules restantes en cellules du sulcus de forme cubique (Kamiya *et al.*, 2001). En revanche, les cellules de soutien de bord et phalangiennes qui entourent les cellules ciliées internes sont conservées. La transformation des cellules de soutien en cellules du sulcus interne est fortement dépendante des hormones thyroïdiennes. En effet, l'administration de propylthiouracil (PTU) connue pour développer une hypothyroïdie entraîne le maintien des cellules du Kölliker jusqu'à 1 mois post-natal et l'absence de potentiel évoqué auditif (Uziel *et al.*, 1980). L'administration d'hormone thyroïdienne T4 (thyroxine) chez les souris déficientes permet de restaurer la transformation

des cellules de soutien en cellules cubiques du sulcus ainsi que la maturation fonctionnelle de la cochlée (Uziel *et al.*, 1985).

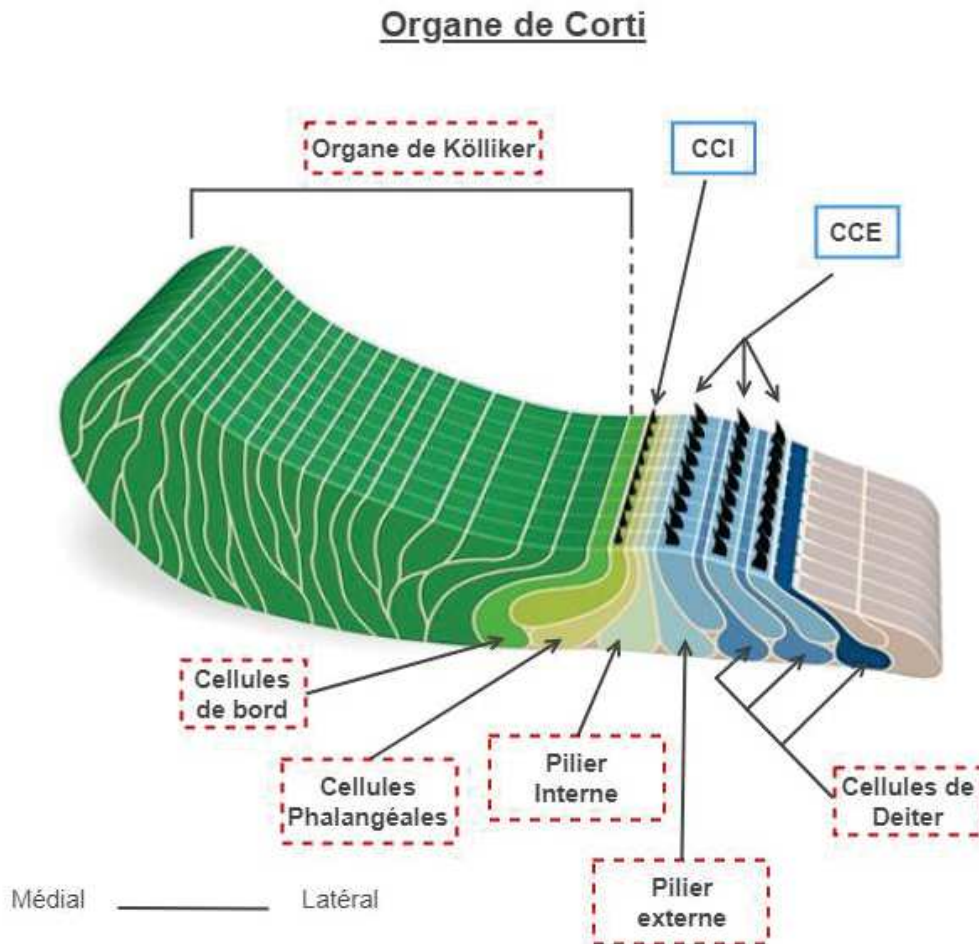


Figure 2.2 : Anatomie de l'Organe de Corti immature. Les différentes populations de cellules de soutien sont encadrées en pointillés rouges, tandis que les cellules sensorielles sont encadrées en bleu. Du côté du modiolus se trouve les cellules du Kölliker. Ces dernières sont séparées des CCI par les cellules de bord. Trois types des cellules de soutien séparent les CCI des CCE immatures : les cellules phalangiennes (accolées aux CCI), les cellules du pilier interne et du pilier externe. Les cellules de Deiters sont associées aux CCE. *Source* : <https://www.the-scientist.com/infographics/mapping-corti-34878>

2.1.2. Activité de l'organe de Kölliker

2.1.2.1. Activité électrique des cellules de soutien

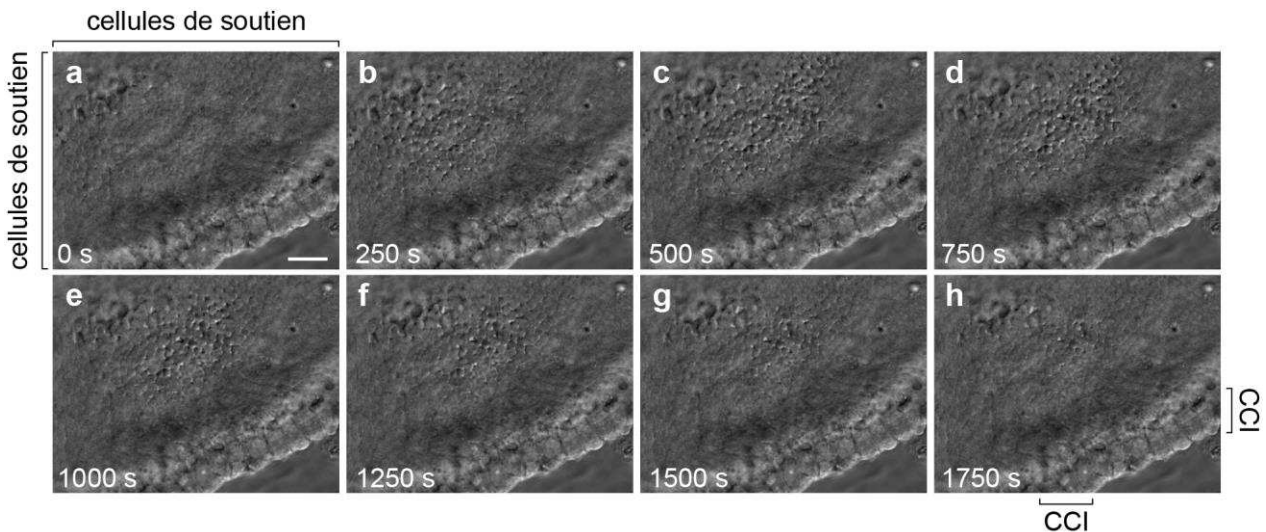
Les cellules de soutien de l'organe de Kölliker montrent une activité spontanée électrique soutenue durant les deux premières semaines post-natale chez la souris (Tritsch *et al.*, 2007; Tritsch and Bergles, 2010). L'enregistrement en patch-clamp des cellules de soutien montre des courants entrants en configuration potentiel-imposé à l'origine de sauts dépolarisants. L'application d'octanol ou bien de carbenoxolone, connus pour bloquer les jonctions communicantes, diminue drastiquement les potentiels extracellulaires enregistrés à proximité des cellules de soutien de l'organe du Kölliker (Tritsch *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent que l'activité des cellules de soutien est dépendante d'un transfert de second messenger au travers des jonctions communicantes du syncytium. La diminution de calcium extracellulaire étant connue pour augmenter l'ouverture des jonctions communicantes, notamment les demi-canaux composés de connexines, l'application d'EGTA, un chélateur calcique, augmente l'activité électrique des cellules de soutien (Tritsch *et al.*, 2007). L'application des bloqueurs des récepteurs cholinergiques $\alpha 9\alpha 10$, tels que la strychnine, l'atropine et la d-tubocurarine ne modifie pas l'activité électrique des cellules du Kölliker (Tritsch *et al.*, 2007). En revanche, l'application d'antagonistes des récepteurs purinergiques à large spectre, à savoir le PPADS et la suramine entraîne une diminution des potentiels extracellulaires au sein de l'organe du Kölliker (Tritsch *et al.*, 2007). Ces résultats pourraient s'expliquer par une sécrétion d'ATP et l'activation de récepteurs P2X et P2Y présents à la surface des cellules de soutien. En accord avec ces résultats, l'incubation des explants cochléaires avec de l'apyrase, qui est une ecto-nucléotidase dont le rôle est d'hydrolyser l'ATP extracellulaire, diminue fortement l'activité électrique de l'organe du Kölliker (Tritsch *et al.*, 2007).

2.1.2.2. Activité calcique des cellules de soutien

L'utilisation de sondes calciques telles que le Fura-2 et le Fluo-3 a permis de mettre en évidence une activité calcique évoquée et spontanée dans les cellules de soutien de l'organe de Kölliker (Anselmi *et al.*, 2008; Rodriguez *et al.*, 2012; Tritsch *et al.*, 2007; Tritsch and Bergles, 2010). Une application d'ATP au niveau de la grande ou bien de la petite crête épithéliale entraîne une élévation de calcium intracellulaire suivie par la propagation d'une vague calcique le long des autres cellules de soutien. De façon intéressante, des vagues calciques sont aussi observées spontanément le plus souvent dans la région de la grande crête épithéliale (Anselmi *et al.*, 2008; Tritsch *et al.*, 2007). Quelle que soit la nature des vagues calciques (évoquée ou spontanée), la propagation de ces dernières est diminuée en présence d'octanol, de PPADS, de suramine et d'apyrase indiquant une dépendance aux jonctions communicantes et à l'ATP extracellulaire (Anselmi *et al.*, 2008; Rodriguez *et al.*, 2012; Tritsch *et al.*, 2007; Tritsch and Bergles, 2010). De plus, la mobilisation du calcium intracellulaire est tributaire du transfert de l'inositol triphosphate (IP3) entre les cellules de soutien (Beltramello *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent que la propagation de l'ATP et la mobilisation du calcium intracellulaire pourraient correspondre à l'activité électrique des cellules de soutien de l'organe de Kölliker. De plus, ces résultats pourraient s'expliquer par une sécrétion d'ATP via des demi-canaux formés par des connexines dans l'espace extracellulaire. L'ATP une fois libéré activerait des récepteurs purinergiques des cellules de soutien voisines, ce qui mobiliserait le calcium intracellulaire et favoriserait la sécrétion d'ATP. Ceci entraînerait alors un nouveau cycle de stimulation se propageant de proche en proche.

2.1.2.3. Mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire et libération de KCl

Récemment, il a été proposé que les vagues calciques correspondent à des vagues de chlorure de potassium (Wang *et al.*, 2015). L'application d'ATP sur des cellules de soutien isolées évoque un courant transmembranaire dont le potentiel d'inversion est proche du potentiel d'équilibre du chlore (-40 mV). En accord avec ces résultats, les cellules de soutien à proximité des cellules ciliées internes expriment le canal chlorure ANO1 (ou TMEM16A) (Wang *et al.*, 2015). Ainsi une application d'ATP mobiliserait le calcium intracellulaire, qui à son tour activerait le canal chlore ANO1, entraînant une sécrétion de chlore dans le milieu extracellulaire. Il a été proposé que cette dernière soit associée à une sortie de potassium, conduisant à une vague de chlorure de potassium à proximité des cellules ciliées internes (Fig



2.3).

Figure 2.3 : Variation spontanée de la réfringence des cellules de soutien de l'organe du Kölliker.

(a-h) Cellules de soutien de l'organe de Kölliker et cellules ciliées internes observées en microscopie à contraste d'interférence différentielle. L'accumulation de matériel dense, pouvant correspondre à l'accumulation d'ATP et/ou de KCl, entre les cellules de soutien entraîne une modification de la réfringence. CCI : cellules ciliées internes. Barre d'échelle : 10 μm .

2.2. Les cellules ciliées

2.2.1. Anatomie des cellules ciliées immatures

2.2.1.1. Développement de la touffe ciliaire

Les cellules ciliées internes et externes se différencient dès E18 chez le rongeur, et à la 12^{ème} semaine *in utero* chez l'homme (**Fig 2.4**). Les cellules ciliées sont facilement reconnaissables grâce au développement de leurs stéréocils. Cette stéréociliogénèse comprend plusieurs étapes, à savoir la production initiale des stéréocils, la formation des différentes rangées de stéréocils et la résorption des stéréocils surnuméraires. Si la différenciation des touffes ciliaires est similaire entre les CCI et CCE, elle commence par les CCI. D'une touffe arrondie et polarisée par un kinocil, l'appareil de mécanotransduction se développe avec un arrangement en "V", avec la pointe du V centré sur le kinocil. Sur les CCI, l'arrangement en V est plus ouvert et notamment à la base de la cochlée avec une forme pratiquement linéaire. Sur les CCE, l'arrangement des stéréocils peut devenir en W, en raison de l'absence de quelques cils face au kinocil. Ce dernier disparaît à la fin de la deuxième semaine postnatale, soit précédant ou de façon concomitante à l'entrée en fonction de la cochlée.

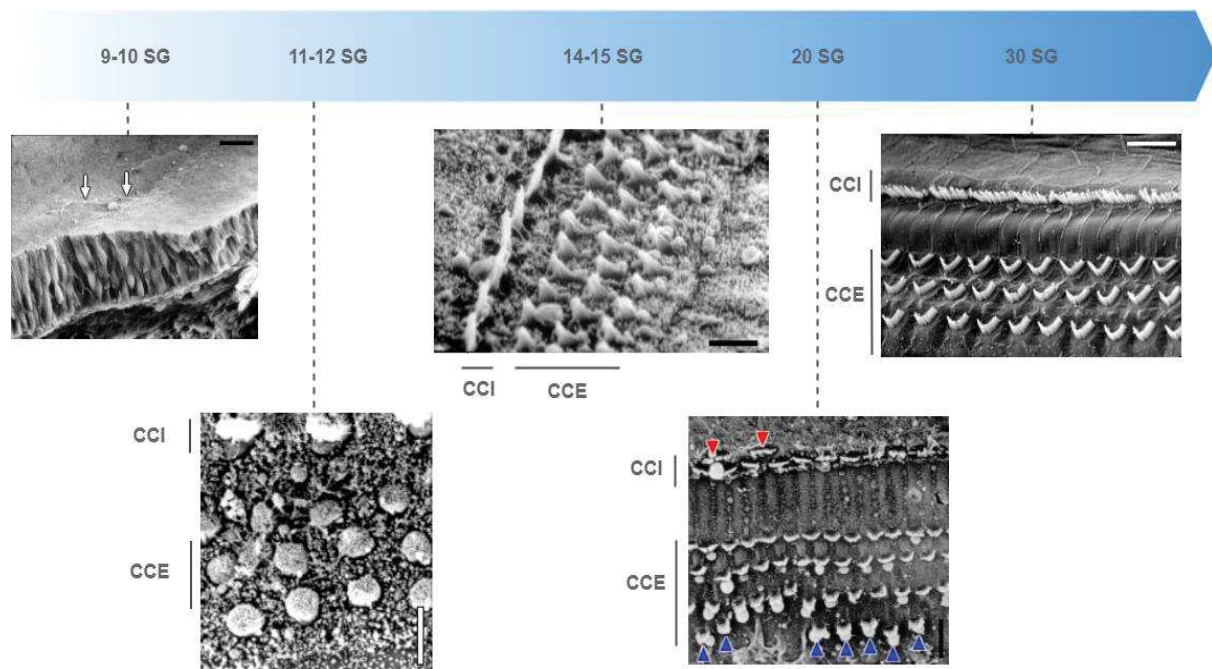


Figure 2.4 : Développement des stéréocils de l'organe de Corti chez l'Homme. (9-10 SG)

L'épithélium sensoriel n'est pas différencié ; néanmoins quelques filaments indiquent une membrane tectoriale naissante (flèches blanches). Échelle : 25 μ m. (11-12 SG) Surface des cellules ciliées naissantes, observées en microscopie à balayage. Les touffes circulaires des stéréocils des CCI et CCE se distinguent des microvillosités qui tapissent les cellules de soutien. Échelle : 10 μ m. (14-15 SG) Les stéréocils des CCI et CCE se développent et commencent à s'organiser comme chez l'adulte avec une disparition des touffes circulaires. Échelle : 10 μ m. (20 SG) Des cellules ciliées surnuméraires sont fréquemment et temporairement observées au cours du développement ; comme ici on note 2 rangées de CCI (flèches rouges) et 4 à 5 rangées de CCE (flèches bleues). Échelle : 20 μ m. (30 SG) A la fin de son développement, l'organe de Corti est identique à celui-ci (rat adulte). Les microvillosités ont pratiquement disparues de la surface des cellules annexes, notamment des piliers. Source : <http://www.cochlea.eu/developpement-et-plasticite/cochlee>

2.2.1.2. Développement des synapses

Les synapses des cellules ciliées se caractérisent par un élément dense aux électrons, le ruban synaptique. Ce dernier est entouré d'une monocouche de vésicules synaptiques, ancré à la membrane plasmique et faisant face à la densité post-synaptique des fibres du nerf auditif (Nouvian *et al.*, 2006). Les rubans synaptiques sont nécessaires pour assurer un transfert rapide et synchrone de l'information acoustique (Becker *et al.*, 2018; Frank *et al.*, 2010; Jean *et al.*, 2018; Khimich *et al.*, 2005). Chez l'adulte, un seul ruban, de forme ovoïde, est présent à chaque synapse, et les canaux calciques, nécessaires à la fusion vésiculaire, sont localisés sous forme d'une à deux bandes en dessous du ruban (Frank *et al.*, 2010; Rutherford and Pangršič, 2012; Wong *et al.*, 2014). Au cours du développement, à l'inverse, les zones actives se caractérisent par de multiples rubans de forme sphérique, dont le nombre à P6 (environ 20 rubans par CCI) est deux fois supérieur à celui mesuré chez l'adulte (environ une dizaine de rubans par CCI) (Wong *et al.*, 2014). L'observation en microscopie électronique à transmission démontre que ces rubans immatures ont une taille plus petite (100 nm) par rapport aux rubans des CCI adultes (environ 170 nm pour l'axe le plus long) et avec moins de vésicules liées autour (Wong *et al.*, 2014). Les rubans synaptiques adultes sont ancrés à la membrane plasmique sur toute leur longueur par un seul élément présynaptique (densité présynaptique), probablement correspondant à Bassoon. A l'inverse, les rubans immatures sont liés à la membrane par au moins 2 densités présynaptiques. L'observation de la protéine Bassoon et des canaux calciques en microscopie confocale montre une distribution sous forme circulaire. A noter que des synapses sans ruban, mais avec des densités pré-synaptiques et post-synaptiques, sont observées chez le jeune (Wong *et al.*, 2014).

2.2.2. Activité électrique des cellules ciliées internes immatures

Chez l'adulte, les cellules ciliées internes transforment les ondes sonores en un message nerveux. L'arrivée d'une stimulation acoustique entraîne la déflexion des stéréocils et l'ouverture du canal sensible à l'étirement présent au niveau des stéréocils. L'entrée du potassium contenu dans l'endolymphe qui dépolarise la cellule ciliée et l'activation de conductance potassique assurant sa repolarisation donne naissance au potentiel de récepteur. Ce dernier se caractérise par deux composantes : une composante alternative qui suit la fréquence de la stimulation et une composante continue qui reproduit l'enveloppe de la stimulation sonore. Pour des stimulations sonores de fréquences inférieures à 1 kHz, la composante alternative domine la réponse électrique des CCI et permet aux cellules sensorielles auditives de répondre en phase avec la stimulation. A l'inverse, au-delà de 1 kHz, la composante continue est prédominante, en raison de la constante de temps membranaire qui se comporte comme un filtre passe-bas; ainsi, pour des stimulations acoustiques supérieures à 1-2 kHz, les CCI codent l'enveloppe de la stimulation sonore ([Palmer and Russell, 1986](#)). A l'inverse les cellules ciliées au cours du développement émettent spontanément des potentiels d'action calciques (**Fig 2.5**). Ainsi, les CCI acquièrent de nouvelles conductances au cours du développement, qui leur permettront lors de l'entrée en fonction de la cochlée de passer d'un mode pacemaker (émission de potentiel d'action) à une fonction de transduction (génération d'un potentiel de récepteur).

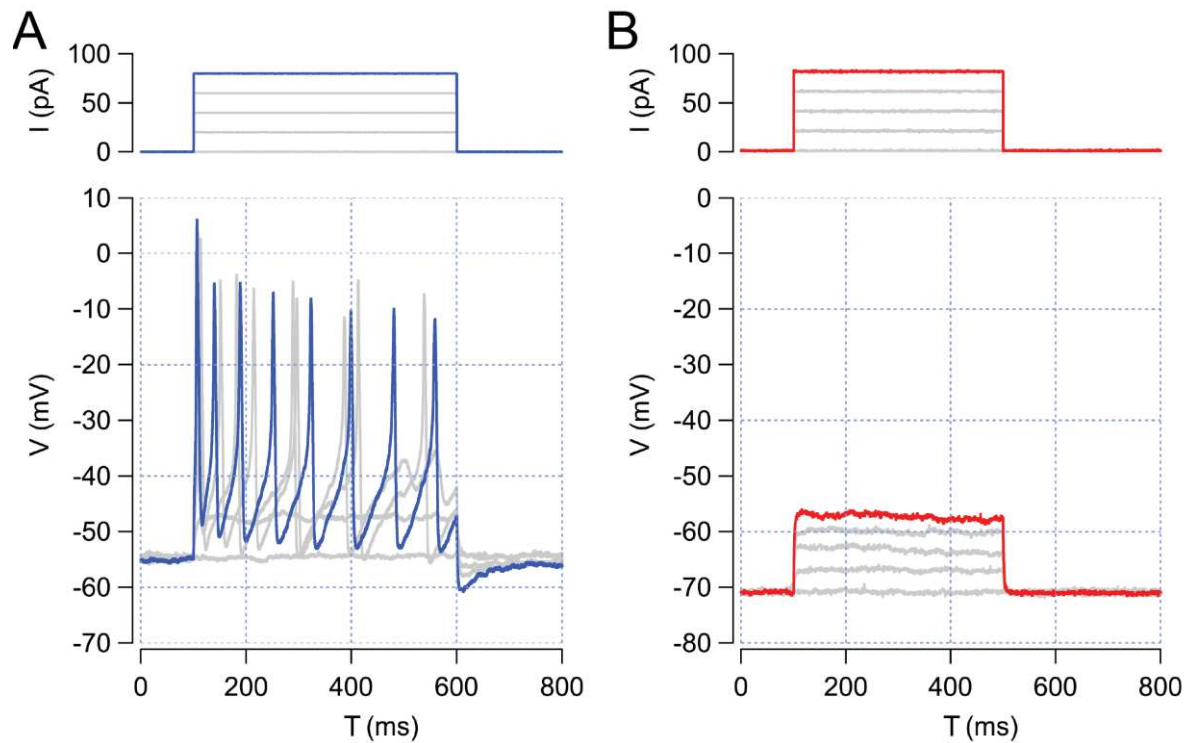


Figure 2.5 : Activité électrique des cellules ciliées internes. (A) L'injection de courants dépolarisants (+40 à +80 pA) entraîne l'émission de potentiels d'action chez une cellule ciliée immature (bleu). **(B)** L'injection de courants dépolarisants (+20 à +80 pA) provoque l'apparition d'un potentiel de récepteur, c'est-à-dire, une variation graduelle du potentiel de membrane qui est fonction de l'intensité de stimulation, chez une cellule ciliée adulte (rouge).

2.2.2.1. Canaux et récepteurs ioniques

2.2.2.1.1. Courant mécano-transducteur, I_{MET}

L'arrivée d'une onde sonore provoque la déflexion des stéréocils, ce qui favorise l'ouverture du canal sensible à l'étirement, dont la nature moléculaire qui a récemment été élucidée correspond au canal TMC1 (Pan *et al.*, 2018). Ce dernier est un canal cationique non-sélectif. Le courant mécano-transducteur des cellules vestibulaires, I_{met} , est présent à des stades très précoces du développement, à partir de E17, avec des amplitudes et cinétiques d'activation semblables à l'état adulte (Géléoc and Holt, 2003). A l'inverse, chez les cellules ciliées externes de la cochlée, le courant I_{met} apparaît de façon progressive durant la première post-natale et

selon un gradient base-apex ([Waguespack et al., 2007](#)). Ces résultats suggèrent donc que le canal de mécano-transduction est fonctionnel chez les cellules ciliées immatures. Cependant, la forte concentration de calcium dans l'endolymphe au cours de la première semaine post-natale pourrait prévenir son implication dans l'activité électrique des CCI, notamment dans l'émission de potentiels d'action. En effet, le canal de mécano-transduction est caractérisé par un site de fixation au calcium qui diminue sa probabilité d'ouverture ([Peng et al., 2013](#)). Au cours de la première semaine après la naissance chez la souris, la concentration de calcium est d'environ 1.3 mM dans l'endolymphe, similaire à la concentration calcique de la périlymphe, prévenant donc l'ouverture du canal. A partir de la deuxième semaine post-natale, la concentration de calcium dans l'endolymphe diminue pour atteindre 50 μ M, augmentant par conséquent la probabilité d'ouverture du canal de mécano-transduction, ce qui favorise la dépolarisation des CCI et l'émission spontanée de potentiels d'action ([Johnson et al., 2012](#)). Ainsi, la période pendant laquelle les cellules ciliées internes sont capables d'émettre des potentiels d'action de façon spontanée ne serait pas limitée à la première semaine développementale mais pourrait être étendue à la deuxième semaine post-natale chez la souris, c'est-à-dire, jusqu'à l'entrée en fonction de la cochlée ([Kros et al., 1998](#)).

2.2.2.1.2. Conductances ioniques sensibles au potentiel, $I_{Ca^{2+}}$, I_{K^+} et I_{Na^+}

Les cellules ciliées internes immatures expriment ainsi un courant calcique correspondant à la sous-unité $\alpha 1D$ du canal calcique de type L (Cav1.3, [Baig et al., 2011](#); [Platzer et al., 2000](#)). Ce courant est essentiel à l'exocytose des vésicules synaptiques ([Brandt et al., 2005](#); [2003](#)). L'amplitude du courant calcique augmente avec le développement pour atteindre une taille maximum une semaine après la naissance et diminuer jusqu'à l'entrée en fonction ([Beutner and Moser, 2001](#)). La diminution du nombre de canaux calciques au cours de

la seconde semaine post-natale est associée à une distribution préférentielle aux synapses et à une augmentation de l'efficacité de libération synaptique (Wong *et al.*, 2014).

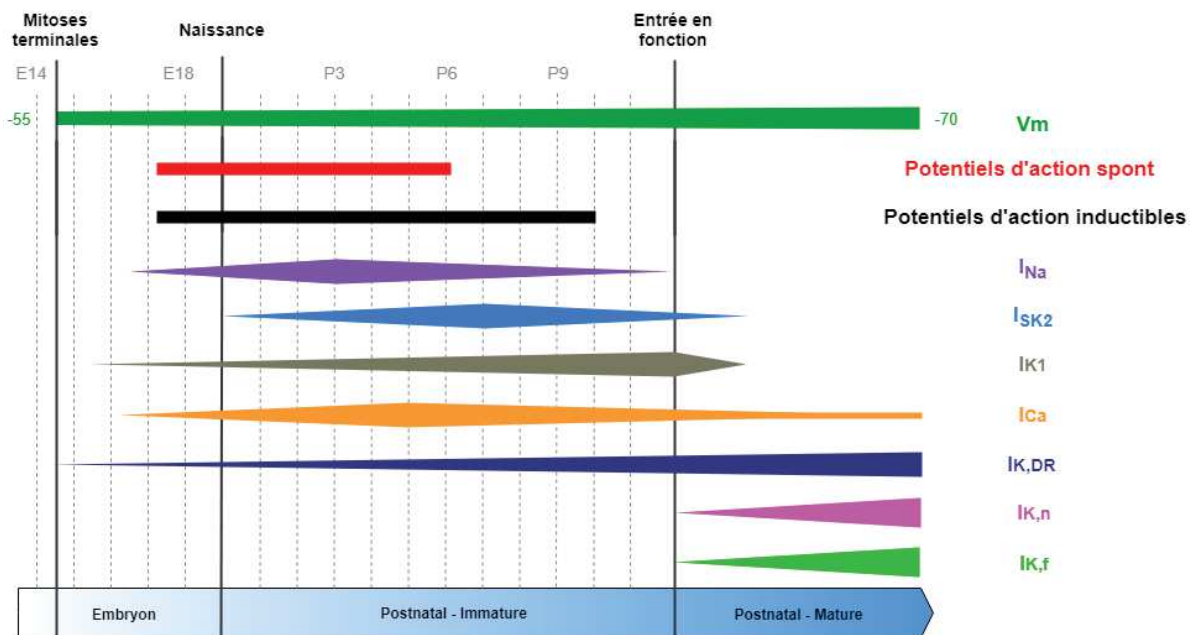


Figure 2.6 : Changements développementaux dans l'expression des propriétés biophysiques des CCI. La largeur des bandes reflète l'importance de l'expression des courants ioniques ou du potentiel de membrane (V_m) dans les CCI apicales. Le jour de naissance (P0) correspond au jour embryonnaire 19,5 (E19,5). Adapté de Marcotti, 2012.

Les CCI immatures expriment différentes conductances potassiques sensibles au potentiel. La conductance $I_{K,DR}$ reflète un courant potassique rectifiant retardé dont l'amplitude augmente au cours du développement pour devenir $I_{K,s}$ chez l'adulte (Kros *et al.*, 1998; Marcotti *et al.*, 2003a). Le courant $I_{K,DR}$ est essentiel dans la phase de repolarisation des potentiels d'action calciques (Marcotti *et al.*, 2003a). Un autre courant potassique rectifiant entrant, $I_{K,1}$, est exprimé de façon transitoire permettrait de maintenir la CCI à son potentiel de repos (Marcotti *et al.*, 1999). Il a été aussi proposé que les CCI expriment un courant sodique, I_{Na^+} , sensible à la TTX (Eckrich *et al.*, 2012; Marcotti *et al.*, 2003b). L'invalidation

pharmacologique de ce canal diminuerait la vitesse de dépolarisation des potentiels d'action ainsi que leur fréquence d'émission (Marcotti *et al.*, 2003b).

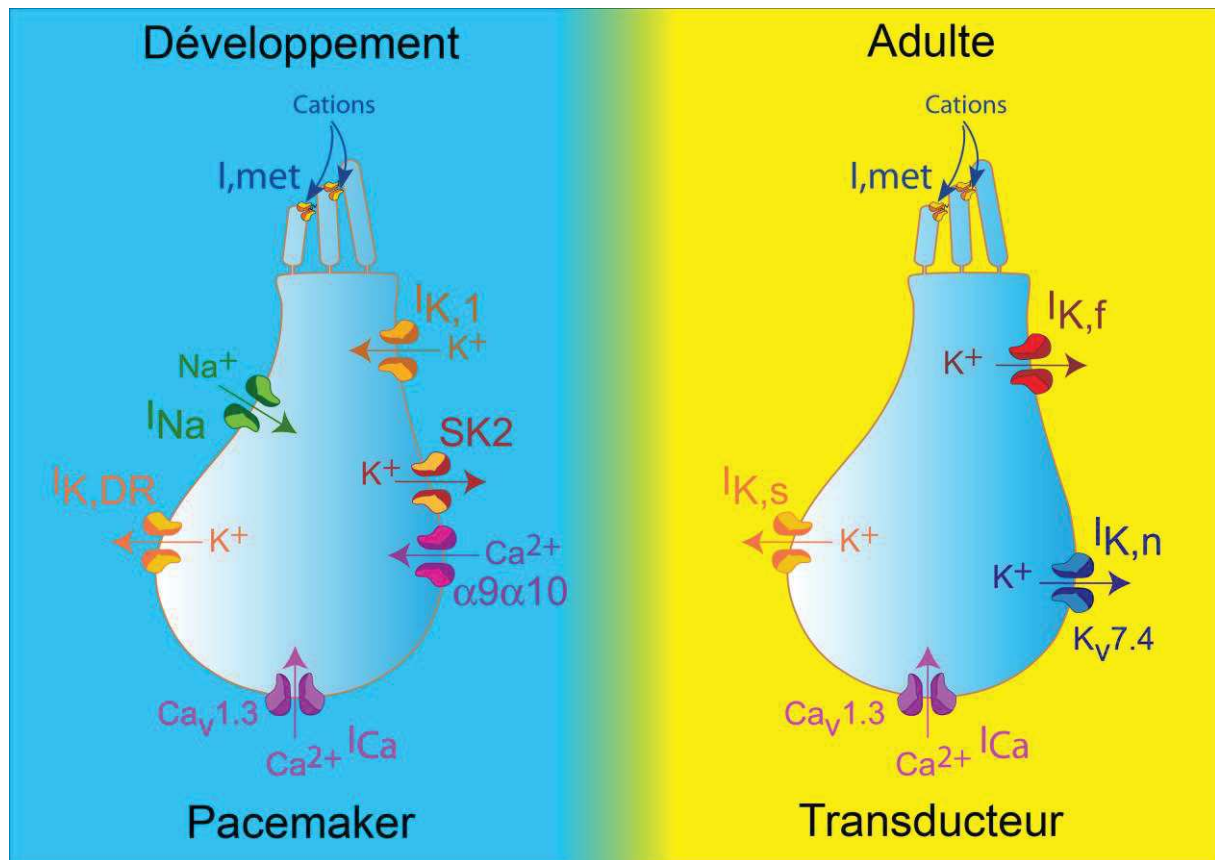


Figure 2.7 : Maturation et expression des courants ioniques au cours du développement.

Gauche : les cellules ciliées internes immatures se caractérisent par l'expression de conductances ioniques à savoir un courant sodique (I_{Na}), 3 courants potassiques ($I_{K,DR}$, $I_{K,1}$ et $I_{K,SK2}$) et un courant calcique (I_{Ca}) (Marcotti, 2012). De plus, on note les conductances cationiques correspondant à l'expression du canal de transduction (I_{met}) et des sous-unités nicotiques $\alpha 9\alpha 10$ (Géléoc and Holt, 2003; Glowatzki and Fuchs, 2000; Waguespack *et al.*, 2007). Droite, lors de l'entrée en fonction de la cochlée, le courant sodique I_{Na} et les courants potassiques $I_{K,1}$ et $I_{K,SK2}$ ne sont plus présents. De la même façon, les CCI n'expriment plus les sous-unités nicotiques et deviennent donc insensibles à l'application d'acétylcholine (Katz *et al.*, 2004; Roux *et al.*, 2011). En revanche, l'entrée en fonction des cellules ciliées internes s'accompagne par l'expression de nouvelles conductances potassiques, à savoir le courant potassique $I_{K,f}$, qui se caractérise par une grande conductance et une cinétique d'activation rapide, et le courant $I_{K,n}$, ouvert au potentiel de membrane (Kros *et al.*, 1998; Marcotti *et*

al., 2003a; Oliver *et al.*, 2003). L'amplitude et la cinétique d'activation du courant $I_{K,DR}$ augmente progressivement pour devenir $I_{K,s}$ chez l'adulte (Kros *et al.*, 1998; Marcotti *et al.*, 2003a).

2.2.2.1.3. Récepteur nicotinique et canal potassique SK2

Les CCI sont transitoirement innervées par les fibres efférentes médianes et expriment les récepteurs nicotiques $\alpha 9\alpha 10$ (Simmons, 2002; Zuo *et al.*, 1999). L'enregistrement des CCI post-natales en mode voltage-imposé montre des courants entrants spontanés lorsque le potentiel de maintien est à -90 mV (Glowatzki and Fuchs, 2000). En revanche, au-delà de -60 mV, on observe des courants bi-phasiques, c'est-à-dire un courant entrant suivi d'un courant sortant. Tandis que la strychnine et l' α -bungarotoxine, deux antagonistes de l' $\alpha 9\alpha 10$, bloquent les courants spontanés quel que soit le potentiel de maintien, seul le courant entrant enregistré à -90 mV persiste en présence d'apamine, une toxine spécifique des canaux potassiques SK2 sensibles au calcium. L'ensemble de ces résultats suggère une libération d'acétylcholine par les efférences médianes, qui provoquerait un influx de calcium via le récepteur $\alpha 9\alpha 10$ et favoriserait ainsi l'ouverture du canal potassique sensible au potentiel SK2 (Glowatzki and Fuchs, 2000). En accord avec ces résultats, la dialyse de chélateur calcique comme le BAPTA dans la cellule ciliée via la pipette de patch-clamp prévient le couplage entre l' $\alpha 9\alpha 10$ et le canal SK2 (Glowatzki and Fuchs, 2000).

2.2.2.2. Potentiels d'action et maturation synaptique des CCI

L'enregistrement en patch-clamp des cellules ciliées internes a démontré que ces dernières émettent des potentiels d'action spontanés ou bien évoqués (Beutner and Moser, 2001; Glowatzki and Fuchs, 2000; Kros *et al.*, 1998; Marcotti *et al.*, 2003b; Sendin *et al.*, 2007; Tritsch *et al.*, 2007; Tritsch and Bergles, 2010). L'invalidation par recombinaison homologue de la sous-unité $\alpha 1D$ prévient l'émission des potentiels d'action (Brandt *et al.*, 2003). Bien que

la phase de repolarisation dépende du courant $I_{K, DR}$ (Marcotti *et al.*, 2003a), la perte du canal potassique SK2 prévient la repolarisation de la CCI après l'émission de plusieurs potentiels d'action, modifiant par conséquent le profil de l'activité des CCI (Johnson *et al.*, 2007; Marcotti *et al.*, 2004). A l'inverse, la surexpression de SK2 accélère la repolarisation des potentiels d'action, diminue leur durée et augmente le taux de décharge des CCI (Johnson *et al.*, 2013). Un changement dans la fréquence des potentiels d'action des CCI est associé à un retard de maturation de la machinerie synaptique. Chez l'adulte, l'exocytose des cellules ciliées, mesurée à partir des sauts de capacité membranaire en patch-clamp, suit une fonction linéaire avec l'amplitude du courant calcique (Johnson *et al.*, 2005). A l'inverse, chez le jeune, cette relation est exponentielle. Ces résultats pourraient s'expliquer par un nombre différent de canaux calciques contrôlant l'exocytose des vésicules synaptiques : chez l'adulte, la relation linéaire suggère qu'un nombre limité de canaux calciques contrôle l'exocytose d'une vésicule tandis que chez le jeune, plusieurs canaux calciques contrôlent la fusion des vésicules à la membrane plasmique. La perte ou la surexpression de SK2, entraînant par conséquent une modification dans le taux de décharge des CCI, entraîne une relation exponentielle, et non linéaire comme attendue, entre l'exocytose et l'amplitude du courant calcique chez l'adulte (Johnson *et al.*, 2013; 2007). Ces résultats suggèrent donc une absence de maturation de la machinerie synaptique. De plus, l'ablation génétique de SK2 contrôlée temporellement montre une période critique dans la maturation synaptique, à savoir la deuxième semaine post-natale (Johnson *et al.*, 2013). Ainsi, un changement dans le profil de l'activité des CCI au cours de la première semaine après la naissance ne modifie pas la maturation synaptique des cellules sensorielles. A l'inverse, toute modification de l'activité après P6 entraîne un défaut de maturation de la machinerie synaptique (Johnson *et al.*, 2013).

2.2.2.3. Potentiels d'action et activation de la voie auditive

L'émission des potentiels d'action est associée à une augmentation du calcium intracellulaire (Beutner and Moser, 2001). En accord avec la nature calcique des potentiels d'action, la séquestration du calcium extracellulaire ou bien l'invalidation du canal Cav1.3 des CCI abolit l'émission des potentiels d'action (Brandt *et al.*, 2003; Marcotti *et al.*, 2003b).

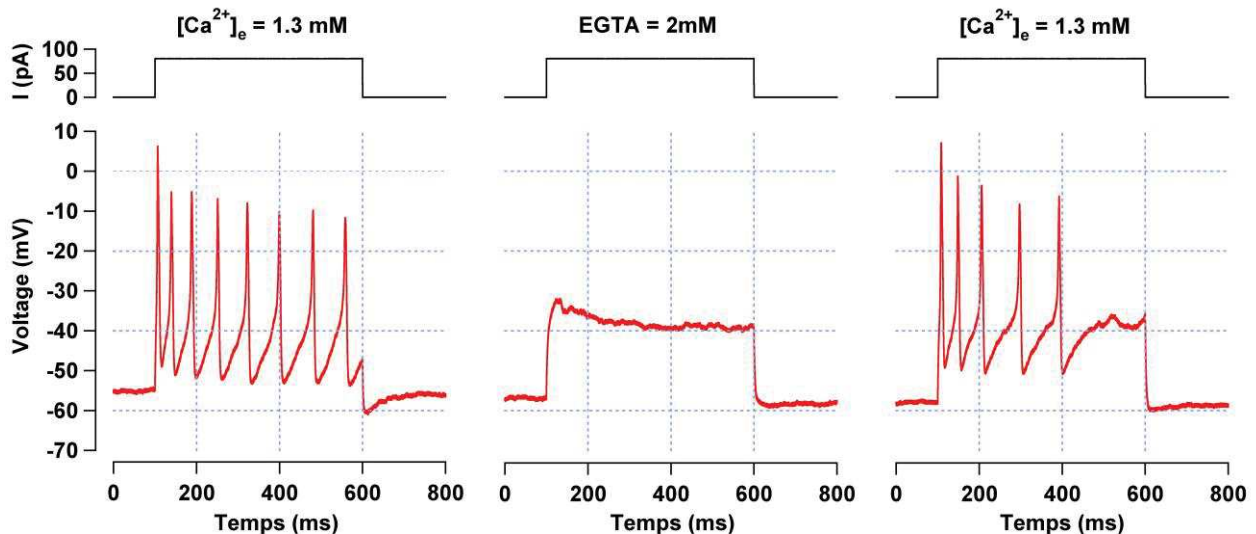
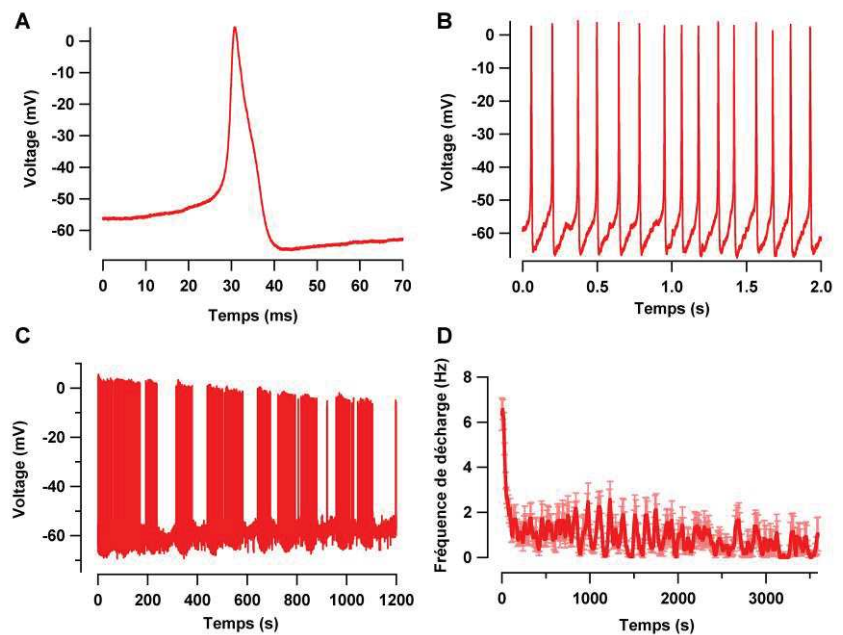


Figure 2.8 : Potentiels d'action calciques évoqués. (A) Potentiels d'action d'une cellule ciliée interne (P8) en réponse à l'injection d'un courant dépolarisant de +70 pA et d'une durée de 500 ms. **(B)** Application d'EGTA et retour à un milieu riche en calcium en **(C)**. Les courants dépolarisants de **(B-C)** sont identiques à **(A)**.

De plus, l'émission de chaque potentiel d'action est associée à l'exocytose des vésicules synaptiques, activant ainsi les fibres du nerf auditif (Beutner and Moser, 2001; Marcotti *et al.*, 2003b). Ce faisant, l'activité spontanée des CCI entraîne l'activation de la voie auditive ascendante (Tritsch *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2013). En raison de l'immaturation de l'oreille au cours du développement, comme par exemple le conduit auditif externe fermé ou bien l'absence d'endolymphe, ce mécanisme permettrait de stabiliser et consolider les synapses des centres supérieurs en absence de stimulation sonore. L'activité intrinsèque au sein de la cochlée et en

particulier le profil de l'activité des CCI serait donc déterminant dans la formation de l'axe tonotopique à savoir la représentation du codage en fréquence, dans chaque relais de la voie auditive (Clause *et al.*, 2017; 2014).

Figure 2.9 : Potentiels d'action spontanés. (A-C) potentiels d'action spontanés d'une CCI (P7) enregistrés en absence de courant injecté ($I=0$ pA). La durée d'observation est de 70 ms, 2 s et 20 min pour (A), (B) et (C), respectivement. (D) moyenne des fréquences de décharge ($n=7$; P5-P6) sur 60 minutes.



2.2.2.4. Profil des potentiels d'action le long du gradient base-apex

Le profil de l'activité spontanée des CCI est controversé. L'enregistrement en patch-clamp selon la configuration "cellule-attaché (cell-attach)" montre une différence du profil de l'activité entre les CCI de la base et celles de l'apex de la cochlée. Ainsi, les CCI basales se caractérisent par une émission de potentiels d'action continue tandis que les CCI apicales auraient une activité en bouffée (Johnson *et al.*, 2011). Dans ce modèle, les centres supérieurs recevant des entrées continues ou bien interrompues se spécialiseraient, respectivement, pour coder des fréquences aiguës ou graves après l'entrée en fonction. Cependant, l'approche utilisée dans cette étude, à savoir la configuration en cell-attach, ne permet pas de mesurer le potentiel de membrane. De plus, le profil des cellules basales était estimé à partir d'enregistrements dont la durée était plus courte par rapport aux cellules apicales. A l'inverse, une autre étude a démontré un profil d'activité homogène des CCI le long du gradient base-apex, à savoir

l'émission de potentiels d'action en bouffée (Sendin *et al.*, 2014). Ici, les cellules étaient enregistrées en configuration de patch-perforé permettant de mesurer le potentiel de membrane sur de longues périodes de temps, à savoir plusieurs dizaines de minutes. Dans cette étude, quelle que soit la position des CCI le long de l'axe tonotopique, l'activité des CCI se caractérise par des bouffées de trains de potentiels d'action d'environ 50 secondes séparés par de longues périodes de silence. Ainsi, dans l'hypothèse d'un raffinement des voies auditives par l'activité spontanée de la cochlée immature, l'organisation de l'axe tonotopique dans les centres supérieurs devrait dépendre de l'activation synchrone d'un nombre limité de CCI. En accord avec cette hypothèse, les CCI voisines se trouvant à moins de 100 μm se caractérisent par une activité similaire, à savoir l'émission de courants entrants (Tritsch and Bergles, 2010).

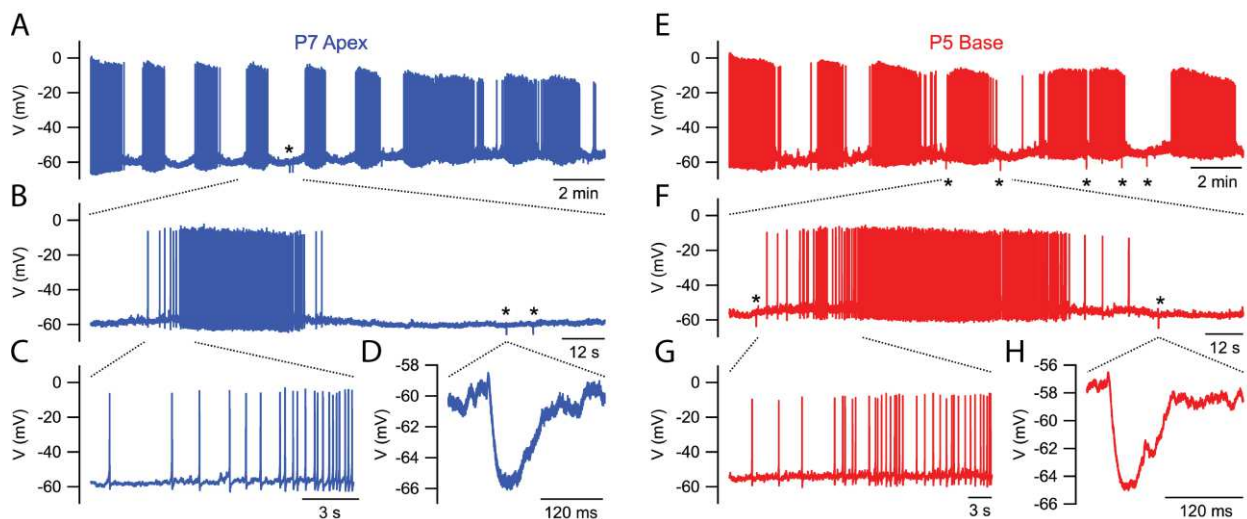


Figure 2.10 : Activité des cellules ciliées le long du gradient base-apex. (A-H) potentiels d'action spontanés d'une CCI (P7) du tour apical (A-C) et d'une CCI du tour basal enregistrés en absence de courant injecté ($I=0$ pA). La durée d'observation est de 70 ms, 2 s et 20 min pour (A), (B) et (C), respectivement. (D) moyenne des fréquences de décharge ($n=7$; P5-P6) sur 60 minutes.

2.2.2.5. Mécanismes à l'origine des potentiels d'action

Les mécanismes à l'origine des potentiels d'action des CCI sont eux aussi fortement débattus. L'ATP, qui se propage à travers les cellules de soutien, pourrait activer directement les récepteurs purinergiques exprimés par les CCI et favoriser alors l'émission des potentiels d'action (Tritsch *et al.*, 2007; Tritsch and Bergles, 2010). Ainsi, l'application de PPADS, un antagoniste des récepteurs purinergiques à large spectre, abolit l'émission de potentiels d'action des CCI (Tritsch *et al.*, 2007). Cependant, l'effet inhibiteur du PPADS sur l'activité des CCI a été mesuré à partir de la technique du patch-clamp en configuration cellule-entière. Dans cette configuration, la forte dialyse du milieu intracellulaire peut provoquer la perte des potentiels d'action et se confondre avec un effet inhibiteur. Parallèlement, l'ATP mobilise le calcium intracellulaire des cellules de soutien entraînant un efflux de KCl, et donc une élévation de potassium à proximité des CCI (Fig 2.11). Ce serait donc la modification du potentiel d'équilibre du potassium qui serait responsable de la dépolarisation des CCI et de l'émission de potentiels d'action (Wang *et al.*, 2015). En accord avec cette hypothèse, une diminution du taux de décharge des potentiels d'action des CCI est observée chez la souris dont le gène qui code pour TMEM16A a été invalidé par recombinaison homologue (Wang *et al.*, 2015). Ici encore, l'ATP a une action excitatrice. A l'inverse, une action inhibitrice de l'ATP sur les CCI a été observée (Johnson *et al.*, 2011). Cet effet pourrait s'expliquer par une activation des récepteurs purinergiques couplés au canal potassique sensible au calcium SK2 des CCI (Fig 2.11). Ainsi l'entrée de calcium via le récepteur à l'ATP favoriserait l'ouverture du canal SK2 et hyperpolariserait la CCI (Johnson *et al.*, 2011). Enfin, l'application d'antagonistes des récepteurs purinergiques à large spectre, à savoir le PPADS et la suramine, ne modifie pas l'activité des CCI, appelant à un mécanisme indépendant de l'ATP (Sendin *et al.*, 2014).

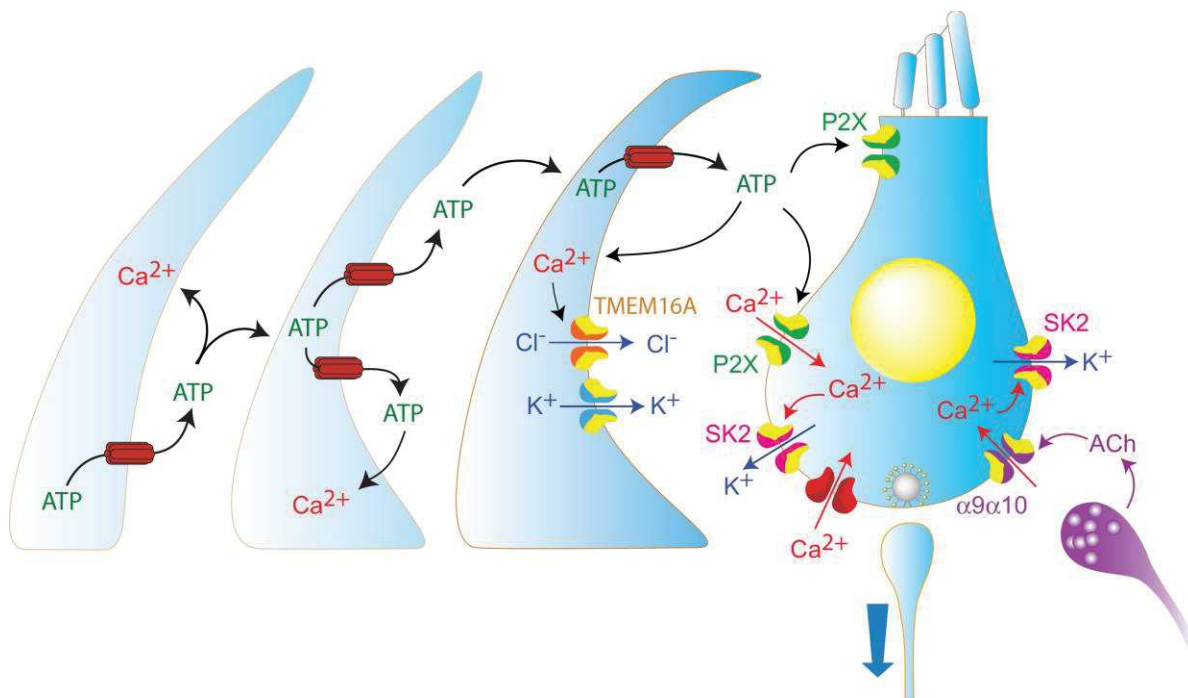


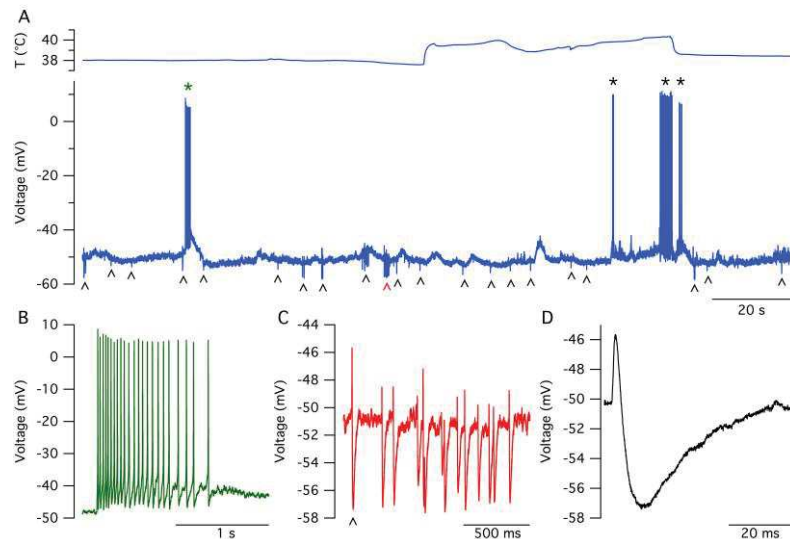
Figure 2.11 : Mécanismes à l'origine de l'activité des CCI immatures. L'ATP est libéré par les cellules de soutien et se propage le long des cellules de soutien adjacentes. La propagation de l'ATP est dépendante des héli-connexines et pourrait aussi impliquer des canaux purinergiques P2X7 (non montré). A proximité des cellules ciliées internes, l'ATP pourrait activer un récepteur purinergique exprimé par les CCI et dépolariiser les cellules sensorielles, ce qui favoriserait l'émission de potentiels d'action (Tritsch *et al.*, 2007; Tritsch and Bergles, 2010). Parallèlement, l'augmentation de calcium intracellulaire dans les cellules de soutien activerait le canal chlorure sensible au calcium (TMEM16A ou ANO1). La sortie de chlore serait aussi associée à une sortie de potassium qui favoriserait, ici encore, la dépolariisation des cellules ciliées et l'émission de potentiels d'action (Wang *et al.*, 2015). Ici l'ATP aurait un rôle excitateur. A noter que la sécrétion de KCl serait reflétée par un changement de réfringence des cellules de soutien en microscopie à contraste d'interférence différentielle (Tritsch *et al.*, 2007). A l'inverse, L'ATP pourrait activer un récepteur purinergique couplé au canal potassique SK2. Sa sensibilité au calcium permettrait à ce dernier d'hyperpolariser la cellule sensorielle. Ici, l'ATP aurait un rôle inhibiteur (Johnson *et al.*, 2011). Cependant l'application d'antagonistes purinergiques à large spectre ne modifie pas le comportement des cellules ciliées, remettant en question le rôle de l'ATP dans l'émission des potentiels d'action (Sendin *et al.*, 2014). Enfin, la libération d'acétylcholine activerait le récepteur nicotinique des CCI. L'influx de calcium activerait alors les canaux potassiques de type SK2 ce qui hyperpolariserait les cellules sensorielles (Glowatzki and Fuchs, 2000; Johnson *et al.*, 2011; Sendin *et al.*, 2014).

2.2.2.6. Modulation de l'activité des CCI immatures

En accord avec l'expression des sous-unités nicotiques $\alpha 9\alpha 10$ couplées au canal potassique SK2 sensible au calcium (Simmons, 2002; Zuo *et al.*, 1999), l'application d'acétylcholine provoque l'activation d'une conductance potassique prévenant ainsi l'émission de potentiels d'action des CCI (Glowatzki and Fuchs, 2000). De façon intéressante, l'application de strychnine augmente le taux de décharge des CCI, suggérant que les efférences médianes contrôlent le profil de l'activité des CCI (Johnson *et al.*, 2011; Sendin *et al.*, 2014). Cependant, ces données restent débattues. En effet, ces expériences reposent sur des préparations dont les efférences sont sectionnées et dont le nombre de potentiels post-synaptiques inhibiteurs qui reflètent les courants bi-phasiques est faible (Sendin *et al.*, 2014). Cependant, l'invalidation de l' $\alpha 9\alpha 10$ entraîne un défaut de maturation dans les centres supérieurs indiquant que le profil des CCI est régulé par les efférences médianes et serait important dans la consolidation de la voie auditive (Clause *et al.*, 2017; 2014).

Figure 2.12 : Potentiels d'action spontanés et potentiels post-synaptiques inhibiteurs. (A-D)

Activité d'une cellule ciliée interne enregistrée en patch-clamp à température physiologique. Les trains de potentiels d'action (étoiles en **A** et **B**) sont séparés par des périodes de silence dans



lesquelles les potentiels post-synaptiques inhibiteurs (PPSI) sont facilement reconnaissables à leur forme bi-phasique (pointes, **C** et **D**). La phase dépolarisante est due à l'activation du récepteur $\alpha 9\alpha 10$ et à l'entrée de calcium tandis que la phase hyperpolarisante est causée par l'activation du canal potassique SK2, entraînant une sortie de potassium (Nouvian *et al.*, 2015).

2.3. L'innervation au cours du développement

Chez l'adulte, les cellules ciliées sont innervées par 4 types de fibres nerveuses. Les CCI sont contactées par les fibres auditives de type I qui représentent 90 à 95 % de la population du nerf auditif et dont le rôle est de véhiculer le message nerveux des CCI vers le noyau cochléaire. En retour les fibres de type I sont innervées par les efférences latérales qui proviennent du noyau de l'olive supérieure latérale et dont la fonction est de moduler l'activité de ces fibres. Les fibres auditives de type II, non-myélinisées et qui représentent 5 à 10 % du contingent des fibres du nerf auditif contactent les CCE et seraient activées suite à des dommages de la cochlée, à savoir véhiculer des informations de type douleur. Enfin, les CCE sont directement contactées par les fibres efférentes cholinergiques dont le corps cellulaire est situé dans le noyau dorso-médian du corps trapézoïde, sur le pourtour du complexe olivaire supérieur médian. Au cours du développement, le profil de l'innervation change progressivement pour assurer une transmission fidèle et efficace du message nerveux vers les centres supérieurs (**Fig 2.13**).

2.3.1. Innervation afférente

L'entrée des fibres afférentes commence à un stade de développement qui précède la différenciation des cellules ciliées. L'innervation de la cochlée se déroule selon un axe longitudinal (de la base vers l'apex) et selon un axe radial (du modiolus vers la strie) ([Bulankina and Moser, 2012](#)). Cette innervation se caractérise par une ramification des fibres nerveuses visibles à E12.5, et qui est suivie par une élimination synaptique dès E15.5 à la base de la cochlée, ce qui conduit à un contact unique entre une fibre nerveuse et une CCI chez l'adulte ([Bulankina and Moser, 2012](#); [Koundakjian et al., 2007](#); [Rubel and Fay, 2012](#)). Les fibres de type I semblent innover transitoirement les CCE, avant de disparaître lors de l'entrée en fonction de la cochlée. Il a été proposé que l'innervation des fibres de type I serait dépendante de l'expression transitoire de récepteurs NMDA, en raison de courants somatiques et des

transitoires calciques peri-synaptiques évoqués par du NMDA et bloqués par du CPP. Ainsi, les récepteurs NMDA contribueraient non seulement à maintenir l'activité spontanée des fibres afférentes au cours du développement et mais aussi à maintenir la survie de ces fibres (Zhang-Hooks *et al.*, 2016). Cependant, la forte sensibilité au CNQX des courants glutamatergiques enregistrés au niveau du bouton synaptique suggérerait l'expression exclusive de récepteurs AMPA (Glowatzki and Fuchs, 2002). Si les fibres de type II se caractérisent elles aussi par des courants glutamatergiques sensibles au CNQX (Weisz *et al.*, 2009), elles sont aussi sensibles à l'ATP, connu pour signaler une atteinte de la cochlée, telle qu'un traumatisme acoustique (Gale *et al.*, 2004).

2.3.2. Innervation efférente

L'utilisation de traceur fluorescent a mis en évidence la présence de fibres provenant de l'olive supérieure et projetant vers l'otocyste dès E12, soit avant les premiers signes de différenciation des cellules ciliées. Si à la naissance, les fibres afférentes et efférentes sont présentes au sein de la cochlée en développement, le profil de projection diffère de l'adulte. En effet, à ce stade les fibres efférentes médianes contactent d'abord les CCI avant d'aller innover les CCE à partir de 3 jours après la naissance. Ainsi au cours du développement, les CCI sont transitoirement innervées par les efférences médianes cholinergiques. La libération d'acétylcholine est dépendante de canaux calciques sensibles aux potentiels de type P/Q et N et est négativement régulée par le couplage entre des canaux de type L et des canaux potassiques de grande conductance sensibles au calcium (BK). La libération d'acétylcholine entraîne l'activation de canaux nicotiniques formés par les sous-unités $\alpha 9\alpha 10$ perméables au calcium. L'entrée calcique favorise ensuite l'ouverture de canaux potassiques SK2, ce qui entraîne alors une sortie de potassium, et favorise alors la repolarisation de la CCI (Fuchs and Murrow, 1992). Si un couplage étroit entre les récepteurs $\alpha 9\alpha 10$ et les canaux SK2 explique le courant bi-

phasique observé en patch-clamp, l'utilisation de ryanodine, connue pour dépléter les stores intracellulaires de calcium, suggèrent qu'une amplification du signal calcique de type "calcium-induced calcium release" pourrait aussi participer à la réponse cholinergique de la CCI. Ici, la citerne cytoplasmique présente au niveau de la densité post-synaptique servirait probablement de réservoir calcique pour assurer l'amplification du signal calcique (Fuchs, 2014). A l'entrée en fonction de la cochlée, les CCI ne sont plus innervées par les fibres efférentes. Ces dernières se trouvent essentiellement alors au contact des CCE. Au cours du développement, les CCE sont d'abord contactées par des afférences, puis par les efférences médianes. Ces dernières vont occuper de plus en plus de place et le nombre de contacts afférents va diminuer. Au stade terminal, la CCE est innervée par des efférences dont les terminaisons sont très larges. Ici encore, des citernes cytoplasmiques sont observées au niveau post-synaptique et les réponses cholinergiques des CCE sont fortement similaires à celles observées chez les CCI immatures, à savoir un couplage étroit entre des récepteurs $\alpha 9\alpha 10$ et les canaux SK2, provoquant l'hyperpolarisation des CCE (Erostequi *et al.*, 1994; Blanchet *et al.*, 1996; Oliver *et al.*, 2000).

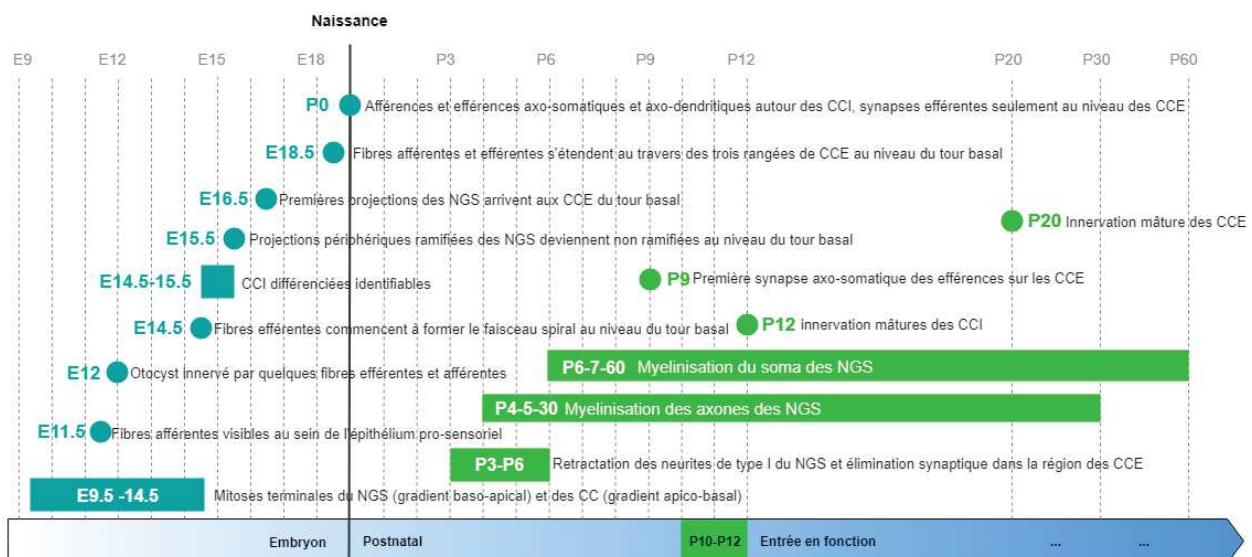


Figure 2.13 : Maturation de l'innervation de l'organe de Corti de souris. Les évènements embryonnaires sont en bleu, et les évènements postnatals sont en vert. Notez la présence de l'innervation afférente aux stades précoces et la naissance. Adapté de Bulankina and Moser, 2012.

Matériel et méthodes

Le soin et l'utilisation des animaux ont suivi le guide de bonne pratique de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm). Le protocole d'expérimentation a été approuvé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, il est enregistré auprès du Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale auprès du Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation sous la référence APAFIS#6235-201709141543234v6.

3.1. Mesure de l'activité électrique et calcique

3.1.1. Préparation de l'explant de l'organe de Corti

Les résultats *in vitro* ont été obtenus sur des souris Swiss, âgées de 1 à 8 jours post-nataux, soit P1 à P8. Après décapitation des souris, les bulles tympaniques étaient rapidement prélevées et placées dans une solution de dissection à 4°C. La composition de la solution était la suivante (en mM) : 141.7 NaCl, 5.36 KCl, 1 MgCl₂-6H₂O, 0.5 MgSO₄-7H₂O, 10 HEPES et 10 glucose ; le pH était ajusté avec du NaOH à une valeur de 7.3 et l'osmolarité était comprise entre 290 et 310 mOsmol.kg⁻¹. La capsule otique était ôtée de chaque cochlée, afin de prélever l'organe de Corti (épithélium neuro-sensoriel de la cochlée) sous loupe binoculaire, au niveau de l'apex ou de la base. L'organe de Corti était ensuite transféré dans une chambre et placé sous un microscope droit (AxioExaminer, Zeiss). La membrane tectoriale, les cellules ciliées externes et les cellules du pilier étaient mécaniquement aspirées à l'aide de pipettes de verre contrôlées par un micromanipulateur (PatchStar, Scientifica). Les cellules phalangiennes n'étaient enlevées que lors des enregistrements en patch-clamp.

3.1.2. Enregistrement des potentiels d'action

Afin d'enregistrer les potentiels d'action sur plusieurs dizaines de minutes, nous avons utilisé la technique du patch-clamp en configuration patch-perforé qui constitue une alternative

à la configuration en cellule-entière (Nouvian, 2007; Sendin *et al.*, 2014). En effet, la dialyse des constituants intracellulaires de la cellule entraîne une réduction de l'amplitude des courants calciques et prévient l'enregistrement des potentiels d'action sur de longues périodes de temps. La configuration patch-perforé mise au point par Horn et Marty tire parti du fait que certains ionophores comme la nystatine ou l'amphotéricine B sont capables de former dans la quasi-totalité des membranes des pores perméables aux ions monovalents et aux molécules d'un diamètre inférieur à 10 angströms (Horn and Marty, 1988). Une fois le "giga seal" accompli, l'amphotéricine B contenue dans la solution interne, perméabilise le morceau de membrane qui se trouve sous la pipette et en diminue la résistance de manière si importante que l'on peut considérer qu'il y a accès électrique à l'espace intracellulaire. Les pipettes de verre utilisées pour le nettoyage et le patch-clamp étaient étirées à partir de capillaires de verre en borosilicate (Kwik Fil, WPI) à l'aide d'une étireuse verticale PIP6 (HEKA). Les pipettes utilisées pour les enregistrements de patch-clamp étaient, de plus, recouvertes à leur extrémité d'un polymère hydrophobe non conducteur, du Sylgard (Dow Corning, Midland, USA), afin de réduire l'accumulation des charges le long de la paroi du verre. Les enregistrements en patch-clamp ont été réalisés à l'aide d'un amplificateur opérationnel EPC10 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Allemagne) contrôlé par le logiciel PatchMaster (HEKA Elektronik). Les résultats étaient ensuite analysés avec le logiciel IGOR Pro (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, OR). Tous les produits chimiques provenaient de Sigma (St. Louis, MO, USA) à l'exception de l'amphotéricine B (Calbiochem, La Jolla, USA). Pour l'enregistrement des potentiels d'action, la composition de la solution externe était la suivante (en mM) : 5.8 KCl, 144 NaCl, 0.9 MgCl₂-6H₂O, 1.3 CaCl₂, 10 HEPES, 10 D-glucose ; le pH était ajusté avec du NaOH à une valeur de 7.3 et l'osmolarité était comprise entre 290 et 310 mOsmol.kg⁻¹. La solution interne remplissant la pipette patch contenait (en mM) : 135 KCl, 10 HEPES, 1 MgCl₂ et 400 µg/ml d'amphotericine B (Calbiochem). Le pH est ajusté à 7.3 avec du KOH et l'osmolarité été comprise entre 290 et

310 mosmol/L. Tous les voltages ont été corrigés pour le potentiel de jonction (-4.4mV). Les enregistrements ont commencé une fois la résistance "série" inférieure à 30 MΩ. Les potentiels d'action ont été enregistrés en configuration courant-imposé sans injection de courant ($I_{inj}=0$ pA), filtrés avec un filtre passe-bas de 5 kHz et échantillonnés à 25 ou 40 kHz. Les cellules dont le courant de fuite excédait -50 pA au potentiel de maintien (-74mV) ont été exclus de l'analyse.

3.1.3. Enregistrement des variations calciques intracellulaires

Les enregistrements en épi-fluorescence ont été réalisés à l'aide de la sonde calcique Fura-2 AM. Le groupement acetoxymethyl (AM) permet au Fura-2 de traverser les membranes bi-lipidiques. Une fois dans les cellules, les estérases cytoplasmiques hydrolysent le groupement AM ce qui piège la sonde à l'intérieur des cellules. Le Fura-2 est une sonde ratiométrique à haute affinité ($K_d = 225$ nM à 37°C), qui permet de mesurer les concentrations calciques intracellulaires indépendamment de la concentration de la sonde. Pour l'enregistrement de l'activité calcique, la composition de la solution externe était la suivante (en mM) : 5.8 KCl, 144 NaCl, 0.9 MgCl₂-6H₂O, 1.3 CaCl₂, 10 HEPES, 10 D-glucose ; le pH a été ajusté à 7.3 avec du NaOH et a une osmolarité comprise entre 290 and 310 mosmol/l. Les préparations étaient ensuite incubées avec du Fura2-AM (10μM ; Thermo Fischer Scientific) et de l'acide pluronique (0.04% ; Thermo Fischer Scientific) dilués dans la solution extracellulaire pendant 30 minutes suivi par 10 minutes de rinçage. Le Fura-2 était excité avec des longueurs d'onde de 350 et 380 nm à l'aide d'un polychrome (TILL-phonics) et au travers d'un miroir dichroïque (Filter set 21 HE, Zeiss). La longueur d'onde d'émission à 505 nm était recueillie grâce à une caméra CDD (Orca-R2, Hamamatsu) avec une résolution spatiale de 4x4 ou 2x2 (binning), un temps d'exposition de 100 ms et une fréquence d'acquisition de 1Hz. La mesure du calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) était reflétée par le ratio f350/f380. L'auto-fluorescence

acquise avant l'incubation de la sonde Fura-2 AM était soustraite des fluorescences f350 et f380.

3.1.4. Mesure de l'activité calcique

Pour mesurer l'activité calcique, des régions d'intérêt (ROI) d'approximativement $20\mu\text{m}^2$ étaient placées au centre des CCI, tandis que la région des cellules de soutien (l'organe de Kölliker) était divisée en plusieurs ROI de $81\mu\text{m}^2$. Le ratio (R) correspond au rapport f350/f380 et $\Delta R = R(t) - R_0$ où t est le temps et où R_0 correspond au niveau basal. Un filtre passe bas (Butterworth [0.005 - 0.1 Hz]) était utilisé pour exclure les variations lentes du signal calcique. En effet, on observait parfois des augmentations lentes et continues du calcium intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), pouvant être dues à l'accumulation de composés toxiques, tels que l'acide acétique et de formaldéhyde, lors de l'hydrolyse du groupement AM, ou bien pouvant refléter une altération du système d'extrusion du calcium (Weiler *et al.*, 2014). Pour chaque préparation, les transitoires calciques étaient détectés lorsque leur amplitude excédait l'écart-type calculé à partir des moyennes de l'activité calcique provenant des ROIs des cellules sensorielles ou de celles de soutien. L'indice de synchronisation entre deux ROI correspond au nombre d'évènements temporellement corrélés (fonction "et" sur Matlab) sur la somme des évènements corrélés et non corrélés (fonction "ou" sur Matlab, **Fig 3.1**). La distance Euclidienne séparant chaque barycentre des ROI était ensuite mesurée pour corrélérer l'indice de synchronisation en fonction de la distance séparant les cellules sensorielles entre elles ou alors séparant les cellules sensorielles et les cellules de soutien. L'analyse de l'activité calcique en 2 dimensions (x et y) en fonction du temps (t) nous a permis de détecter et de suivre les vagues calciques individuelles au sein des préparations. Les images ont été redimensionnées selon un format 145x111 pixels pour avoir une résolution finale d'un pixel par μm indépendamment de la résolution spatiale initiale (2x2 ou 4x4). Pour chaque image, le déplacement des barycentres

et l'aire maximale de chaque vague ont été mesurés. La vitesse d'expansion correspond à la distance parcourue par une vague calcique pour atteindre sa taille maximale divisée par le temps. La fréquence des vagues calciques au sein des cellules du Kolliker a été normalisée par rapport à l'aire observée. La distribution spatiale de l'activité calcique correspond à la projection des vagues calciques enregistrées sur 10 minutes sur un seul plan. Tous les échantillons ont été réalignés en superposant les lignes passant par les centres des barycentres des CCI. L'activité calcique a été mesurée dans les différentes aires de l'organe de Kolliker avec un pas de 2,5µm.

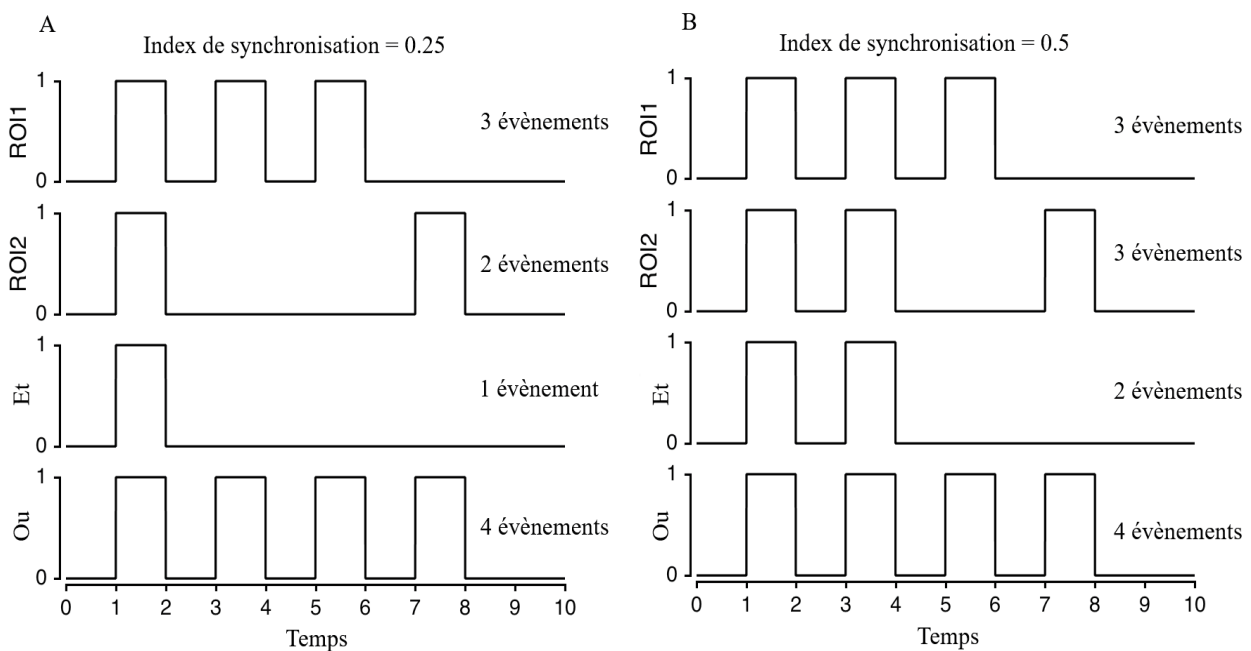


Figure 3.1 : Mesure de l'indice de synchronisation (IS). La fonction "et" ne détecte que les évènements coïncidant temporellement tandis que la fonction "ou" détecte tous les évènements (communs ou non communs). L'IS est égal au rapport de la fonction "et" sur la fonction "ou" (A) Comparaison de l'activité de deux ROI (ROI1 et ROI2) où 3 évènements ont été détectés pour la ROI1 et 2 évènements pour la ROI2. La fonction "et" détecte 1 évènement et la fonction "ou" en détecte 4. L'IS est égal à 1/4 soit 0.25. (B) 3 évènements sont détectés dans les deux ROI mais ils ne coïncident pas temporellement. La fonction "et" marque 2 évènements et la fonction "ou" renvoie 4 évènements, ici l'IS = 2/4 = 0.5.

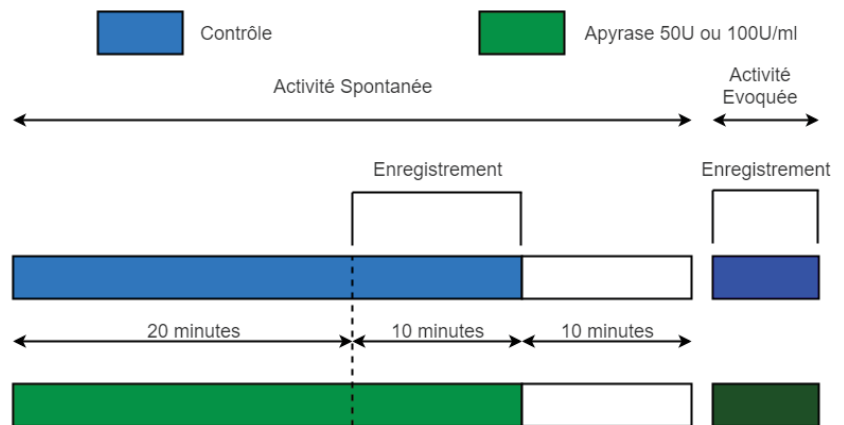
3.1.5. Mesure de la sensibilité à l'ATP

Pour tester la dépendance de l'activité calcique à l'ATP, nous avons utilisé de l'apyrase issue de pomme de terre (Sigma). Cette enzyme est une ecto-nucléotidase qui hydrolyse l'ATP et l'ADP du milieu extracellulaire. L'apyrase a été utilisée à une concentration de 50 ou 100 unités. Une fois diluée l'apyrase est conservée dans la glace jusqu'à utilisation. Les explants étaient incubés dans une solution de Ringer contenant 50 ou 100 U/ml d'apyrase pendant 30 minutes.

L'activité calcique était mesurée au cours des 10 dernières minutes d'incubation. Pour tester l'efficacité de l'apyrase, nous avons ensuite mesuré la propagation de vagues calciques évoquées par l'application d'ATP exogène à la fin des sessions d'enregistrement. En effet, l'application d'ATP entraîne une élévation de calcium dans les cellules de soutien, ce qui provoque la sécrétion d'ATP dans le milieu extracellulaire et un nouveau cycle de stimulation-sécrétion dans les cellules adjacentes (Anselmi *et al.*, 2008; Majumder *et al.*, 2010). 100 μ M d'ATP (Na-ATP, Sigma) contenu dans une micropipette de verre était appliqué pendant 50 ms avec un picospritzer III (Parker Hannafin Corp.) au niveau de la face latérale des cellules phalangiennes internes (CPI). Pour éviter une désensibilisation des récepteurs purinergiques en raison d'une potentielle fuite d'ATP hors de la micropipette, aucune pression positive n'a été appliquée dans la micropipette au cours de sa mise en place. Dans cette configuration, l'ATP contenu dans la pipette pouvait être hydrolysé par l'apyrase contenue dans la solution de Ringer. Aussi, les explants étaient préalablement incubés pendant 10 minutes avec une solution de Ringer sans apyrase (**Fig 3.2**).

Figure 3.2 : Protocole expérimental utilisé pour tester la sensibilité à l'ATP.

L'acquisition des données pendant 10 minutes commence après 20 minutes d'incubation d'une solution de Ringer seule (contrôle, bleu) ou contenant de l'apyrase (vert). Après 10 minutes d'enregistrement un lavage avec du Ringer est effectué. Puis a été étudiée l'activité évoquée par le puff de 100µM d'ATP pendant 50 ms au niveau de la face latérale des CPI.



3.2. Analyses et statistiques

Les explants cochléaires de souris des deux sexes ont été analysés. La moyenne des transitoires calciques (amplitude, fréquence, CV, durée, indice de synchronisation, aire maximale et vitesse d'expansion) a été calculée à partir des moyennes estimées pour chaque explant cochléaire. Les moyennes calculées sont exprimées \pm l'erreur-type et ont été analysées par le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney à deux échantillons (à deux queues). Les moyennes estimées de chaque échantillon individuel sont représentées avec un diagramme de dispersion. Pour les données de tonotopie, nous avons normalisé la taille d'une cochlée avec l'extrême apex correspondant à une valeur de 1 et la région de la base ayant une valeur de 0. Ainsi, les CCI apicales étudiées sont situées à une distance de 0.75 ± 0.02 (valeurs comprises entre 0.69 et 0.83) et les CCI basales sont à une distance de 0.19 ± 0.02 (valeurs comprises entre 0.11 et 0.28). Le nombre de CCI analysées est d'approximativement 10.68 ± 0.4 par explant cochléaire. L'activité des explants cochléaires a été analysée sur les 20

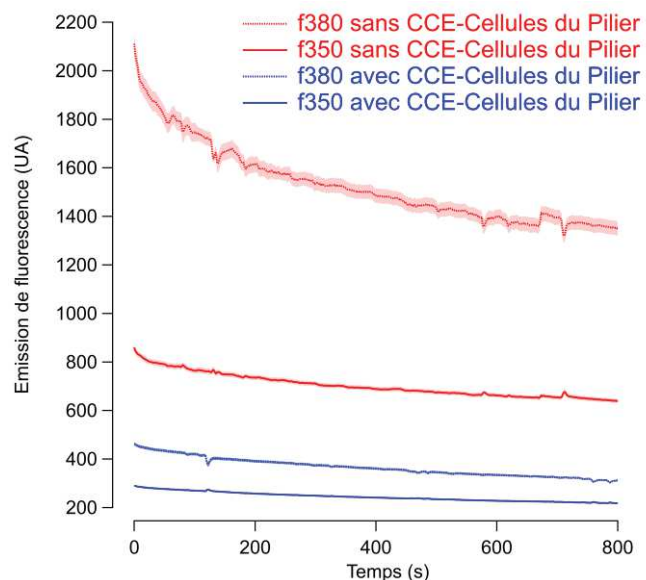
premières minutes d'enregistrement. Les analyses ont été réalisées en utilisant les logiciels Matlab (RRID:SCR_001622) et Igor Pro 7 (RRID:SCR_000325).

Résultats

4.1. Développement de la méthode d'exploration fonctionnelle

En raison de la nature calcique des potentiels d'action des cellules ciliées internes, la mesure des variations calciques des cellules ciliées devrait être un indice fidèle de leur activité électrique. De plus, l'utilisation de sondes calciques devrait nous permettre d'estimer l'activité de plusieurs cellules sensorielles simultanément, à l'inverse des enregistrements en patch-clamp limités à une seule cellule (Sendin *et al.*, 2014). Pour suivre les variations calciques des cellules sensorielles, nous avons utilisé la sonde calcique Fura2-AM, dont le Kd (225 nM) permet de suivre les variations calciques de l'ordre de plusieurs dizaines de nM et dont le groupement acetoxymethyl (AM) permet à la sonde de traverser les membranes bi-lipidiques. L'incubation des explants cochléaires avec l'ensemble des cellules entraîne un faible niveau de fluorescence reflétant une accumulation insuffisante de la sonde dans les cellules ciliées internes (Fig 4.1). En revanche, l'ablation mécanique des cellules ciliées externes et des cellules du pilier externe et interne permet une accumulation raisonnable de la sonde (Fig 4.1).

Figure 4.1 : Variation de l'intensité de fluorescence (U.A) des CCI en présence (bleu) ou en absence des cellules ciliées externes (rouge) en fonction du temps. Émission de fluorescence dans les cellules ciliées internes en réponse à une excitation à 380 nm (traits pointillés) et à 350 nm (traits pleins). La présence des CCE/cellules du pilier prévient l'accumulation de Fura2-AM dans les CCI.



4.2. Variations du calcium intracellulaire et potentiel d'action

Après avoir incubé l'organe de Corti avec la sonde calcique Fura2-AM, des augmentations transitoires de fluorescence, reflétant l'augmentation de calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$), étaient observées au sein des cellules de soutien ainsi que dans les cellules sensorielles auditives, à savoir les cellules ciliées internes immatures (**Fig 4.2 A**). Afin de savoir si les pics calciques des CCI correspondaient à des trains de potentiels d'action, nous avons alors enregistré simultanément l'activité électrique des CCI en patch-clamp couplée à l'imagerie calcique (**Fig 4.2 A, B**). En configuration courant-imposé ($I_{inj} = 0$ pA), l'activité des CCI immatures se caractérisent par des trains de potentiels d'action séparés par des périodes de silence ([Sendin et al., 2014](#)). Chaque train de potentiels d'action était associé à une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, mesurée à partir du ratio f350/f380 (**Fig 4.2 B**). Nous avons ensuite représenté l'augmentation de fluorescence du ratio f350/f380 en fonction du taux de décharge des cellules ciliées internes. Les résultats obtenus à partir de l'analyse de 4 cellules ciliées internes différentes montrent que la concentration de calcium intracellulaire augmente avec la fréquence des potentiels d'action (**Fig 4.2 C**). Ainsi, les transitoires calciques au sein des CCI semblent être de bons indices reflétant l'activité électrique des CCI, à savoir l'émission de train de potentiels d'action. En revanche, la fréquence d'acquisition (1Hz) utilisée en imagerie calcique ne permettait pas de suivre l'émission d'un seul potentiel d'action.

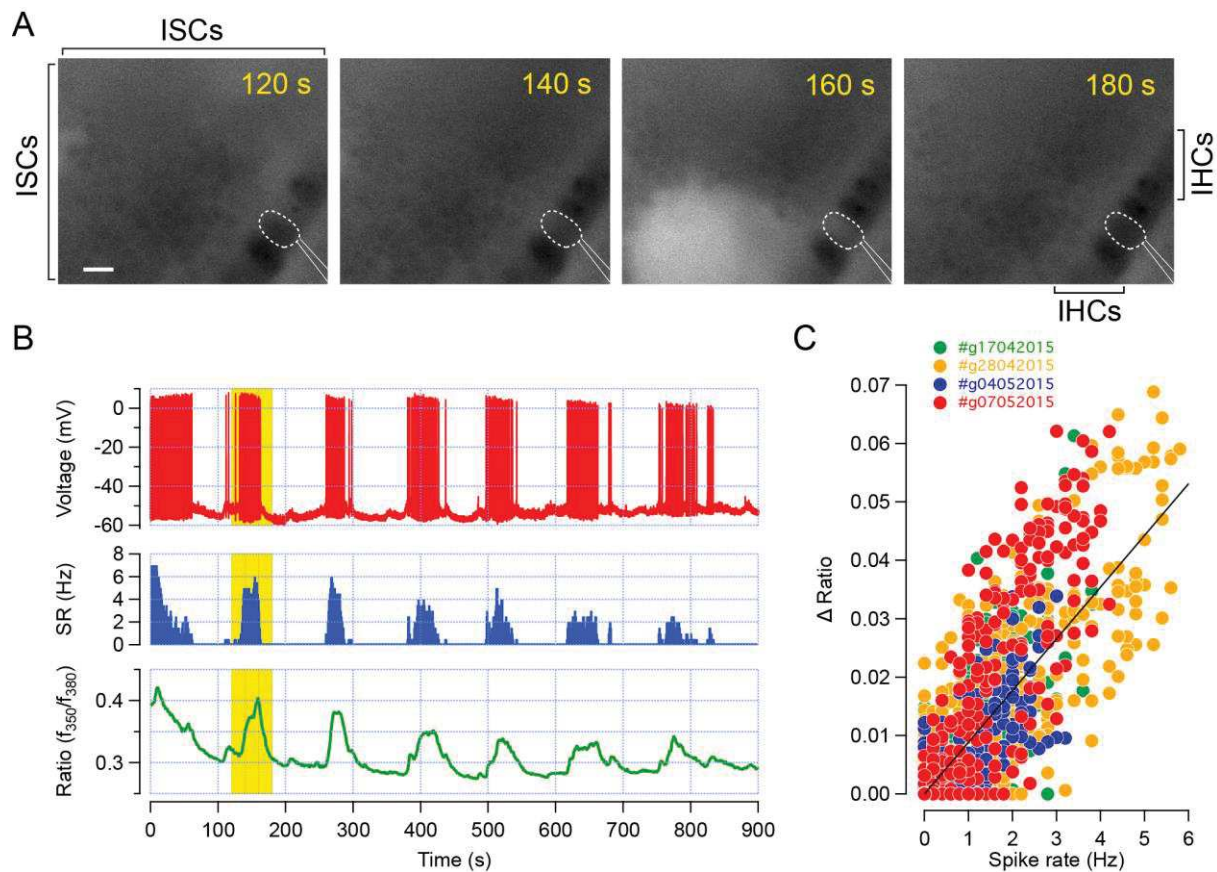


Figure 4.2 : Élévations transitoires du calcium intracellulaire dans les cellules ciliées internes.

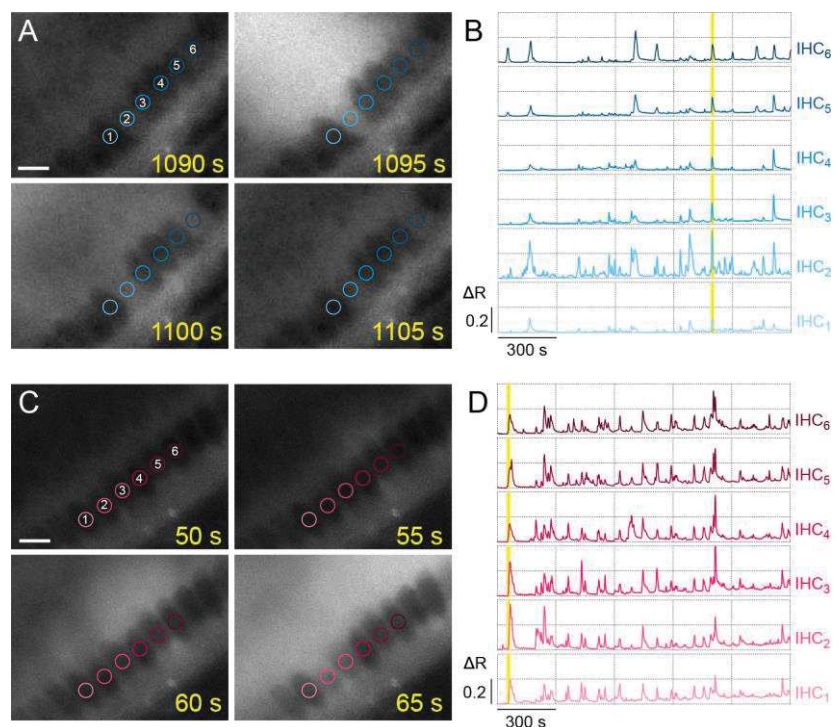
(A) Variations du calcium intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$ dans le tour apical d'une cochlée (âge P6) données par le ratio de fluorescence (f_{350}/f_{380}). Chaque image montre une augmentation spontanée de $[Ca^{2+}]_i$ au sein des cellules de soutien de l'organe de Kölliker et au sein des CCI. La CCI enregistrée en patch-clamp est entourée par des traits pointillés blancs, et la pipette de patch représentée par des traits blancs. L'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ au sein de plusieurs cellules de soutien et de la CCI enregistrée est notamment évidente à 160 secondes (échelle : $10\mu m$). (B) Emission des potentiels d'action (rouge, haut), taux de décharge (bleu, centre) et ratio de fluorescence (f_{350}/f_{380} ; vert, bas) de la CCI enregistrée en (A). Chaque train de potentiels d'action est associé temporellement avec une élévation de $[Ca^{2+}]_i$. La période indiquée en jaune correspond à l'intervalle de temps montré en (A). (C) Variations du ratio de fluorescence (ΔR) en fonction du taux de décharge. Les données ont été enregistrées à partir de 4 préparations différentes (3 tours apicaux entre P5 et P8 et 1 tour basal P7). Chaque point représente le ΔR et le taux de décharge moyenné sur une seconde. La régression linéaire correspondante est affichée en noir. Coefficient de Pearson, $R=0.8$.

4.3. Profil d'activité des cellules ciliées internes

Nous avons ensuite comparé le profil de l'activité des cellules ciliées internes au cours de la première semaine post-natale (**Fig 4.3**). L'activité des CCI apicales et basales était caractérisée par des augmentations spontanées de $[Ca^{2+}]_i$ de 10 à 20 secondes séparées par des périodes de silence. La durée des transitoires calciques était, respectivement, de 14.7 ± 0.4 s et de 14.2 ± 0.5 s pour les CCI apicales aux stades P1-P3 et P6-P7 (**Fig 4.4 B**). La durée des transitoires calciques des cellules ciliées du tour basal était comparable avec celle des cellules du tour apical. En effet, la durée des élévations calciques était, respectivement, de 13.1 ± 0.5 s et 14.6 ± 0.9 s pour des CCI basales aux stades P1-P3 et P6-P7 (**Fig 4.4 B**). Une lente augmentation de la concentration basale de calcium intracellulaire était parfois observée, reflétant probablement une extrusion incomplète du calcium au cours du temps (*Weiler et al., 2014*).

Figure 4.3 : Activité des CCI le long de l'axe tonotopique.

(A, C) Exemples représentatifs d'élévations transitoires et spontanées de calcium intracellulaire dans les CCI du tour apical (A) et basal (C). Échelle : 10 μ m. (B, D) Variations du ratio de fluorescence (ΔR) des 6 CCI adjacentes de (A) et (C) mesurées pendant 25 minutes.



La zone délimitée en jaune correspond aux images montrées en (A) et (C). Les régions d'intérêt sont indiquées par des ronds colorés sur les CCI.

Malgré un taux de décharge plus élevé dans les CCI du tour basal au stade P1-P3, la fréquence des élévations calciques transitoires avait un ordre de grandeur similaire entre les CCI localisées à la base et à l'apex de la cochlée. Ainsi, la fréquence des transitoires calciques était, respectivement, de 0.009 ± 9.10^{-4} Hz et 0.008 ± 7.10^{-4} Hz pour les CCI apicales aux stades P1-P3 et P6-P7. La fréquence des pics calciques était de 0.011 ± 11.10^{-4} Hz et 0.009 ± 7.10^{-4} Hz pour les CCI basales, aux stades P1-P3 et P6-P7, respectivement (**Fig 4.4 A**).

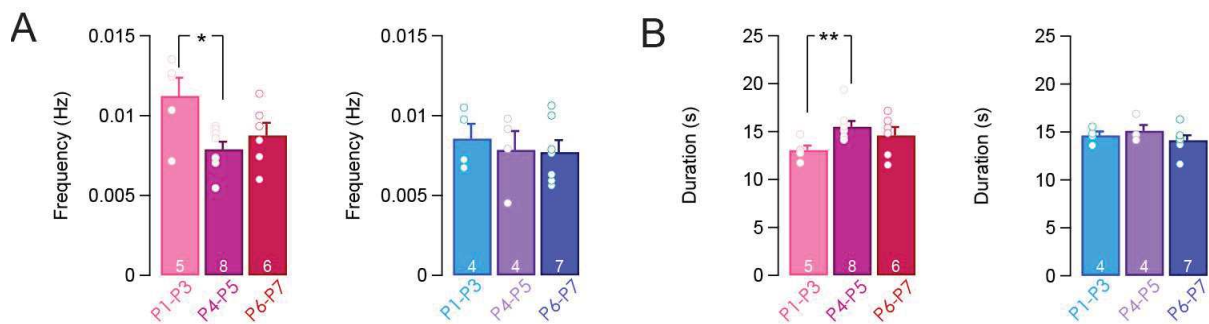
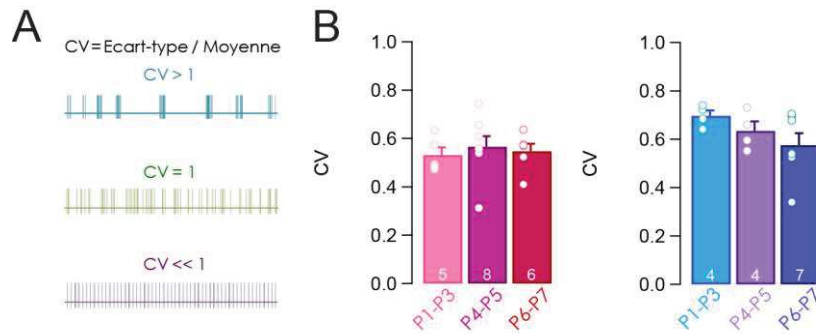


Figure 4.4 : Profil de l'activité des CCI au cours du développement. Fréquence (**A**) et durée (**B**) des élévations transitoires du calcium intracellulaire des cellules sensorielles basales (à gauche, rouge) et apicales (à droite, bleu) durant la première semaine post-natale. ** $p < 0.01$ et * $p < 0.05$. Le nombre de cochlées étudiées est indiqué pour chaque âge.

Nous avons ensuite comparé la distribution temporelle des élévations calciques transitoires des CCI, selon leur position le long de l'axe tonotopique. Pour ce faire, nous avons déterminé le coefficient de variation (CV) à partir de l'intervalle entre les pics calciques transitoires des CCI. Tandis qu'un CV supérieur à 1 reflète un regroupement temporel des événements séparés par de longues période de silence (organisation en bouffée), un CV égal à 1 indique une émission aléatoire des événements (distribution selon la loi de Poisson). En revanche, un CV qui tend vers 0 est la signature d'une distribution régulière des événements. Dans nos expériences, le coefficient de variation était inférieur à 1 pour les cellules apicales, avec respectivement, des CV égaux à 0.70 ± 0.02 et 0.58 ± 0.05 aux stades P1-P3 et P6-P7. De la même façon, l'activité des cellules basales se caractérisait par des CV inférieurs à 1 avec

respectivement des CV égaux à 0.53 ± 0.03 et 0.55 ± 0.03 aux stades P1-P3 et P6-P7. Ici encore, on notait des valeurs comparables des CV entre les cellules ciliées internes du tour apical et du tour basal (**Fig 4.5**). Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que le profil d'activité des CCI est comparable le long de l'axe base-apex de la cochlée au cours du développement.

Figure 4.5 : Distribution temporelle des transitoires calciques des CCI au cours du développement.



(A) Mesure du coefficient

de variation à partir de l'intervalle entre les pics calciques transitoires et organisation temporelle des événements attendus. (B) Coefficient de variation des transitoires calciques des cellules sensorielles basales (à gauche, rouge) et apicales (à droite, bleu) durant la première semaine post-natale. Le nombre de cochlées étudiées est indiqué dans chaque histogramme.

Nous avons ensuite comparé le profil d'activité des CCI selon leur position le long du gradient base-apex. Pour ce faire, nous avons représenté la fréquence, la durée et le CV des transitoires calciques des CCI apicales en fonction, respectivement, de la fréquence, durée et CV des cellules basales pour les âges correspondants (**Fig 4.6**). Cette représentation montre que l'activité entre les cellules ciliées internes est comparable le long de l'axe tonotopique à l'exception notable d'une durée ($p=0.045$, **Fig 4.6 B**) et d'un CV ($p=0.045$, **Fig 4.6 C**) plus élevés pour les CCI apicales à P1-P3 ($p=0.0085$, **Fig 4.6 C**).

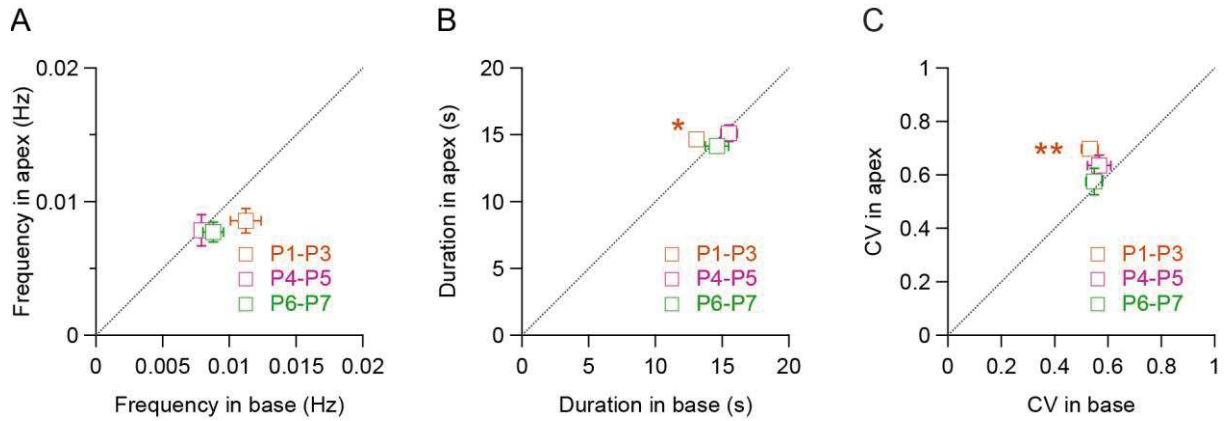


Figure 4.6 : Activité des CCI selon l'axe tonotopique. (A-C) Fréquence (A), durée (B) et CV (C) des pics calciques transitoires des cellules issues du tour apical représentés en fonction de la fréquence, durée et CV des CCI issues du tour basal. *p<0.05. **p<0.01. Nombre de cochlées : P1-P3 base : 5, P1-P3 apex : 4 ; P4-P5 base : 8, P4-P5 apex : 4, P6-P7 base : 6, P6-P7 apex : 7.

4.4. Activité synchrone des cellules ciliées internes adjacentes

Nos résultats suggèrent que le profil d'activité est similaire le long de l'axe tonotopique. Dans l'hypothèse d'un raffinement de la tonotopie des centres supérieurs tributaire de l'activité de la cochlée au cours du développement, nos résultats devraient s'accompagner par une activité synchrone entre les cellules ciliées adjacentes. Pour tester, cette hypothèse, nous avons mesuré l'indice de synchronisation entre les cellules ciliées internes en fonction de leur distance respective.

Nos résultats montrent un taux de synchronisation élevé entre deux cellules ciliées adjacentes du tour apical avec un indice de synchronisation pour une distance de 10 μm , SI_{10} , égale à 0.48 ± 0.03 et 0.62 ± 0.06 aux stades P1-P3 et P6-P7, respectivement (Fig 4.7 A-F). De la même façon, l'indice de synchronisation est élevé pour les cellules ciliées adjacentes du tour basal : SI_{10} , 0.64 ± 0.05 et 0.66 ± 0.06 aux stades P1-P3 et P6-P7, respectivement. En revanche, on observait une faible activité synchrone des cellules ciliées éloignées. Ainsi, l'index de synchronisation pour une distance de 70 μm , SI_{70} , est égal à 0.25 ± 0.1 et 0.16 ± 0.04 dans la

partie apicale aux stades P1-P3 et P6-P7, respectivement et égal à 0.46 ± 0.09 et 0.11 ± 0.02 pour le tour basal, aux stades P1-P3 et P6-P7, respectivement (**Fig 4.7 A-F**).

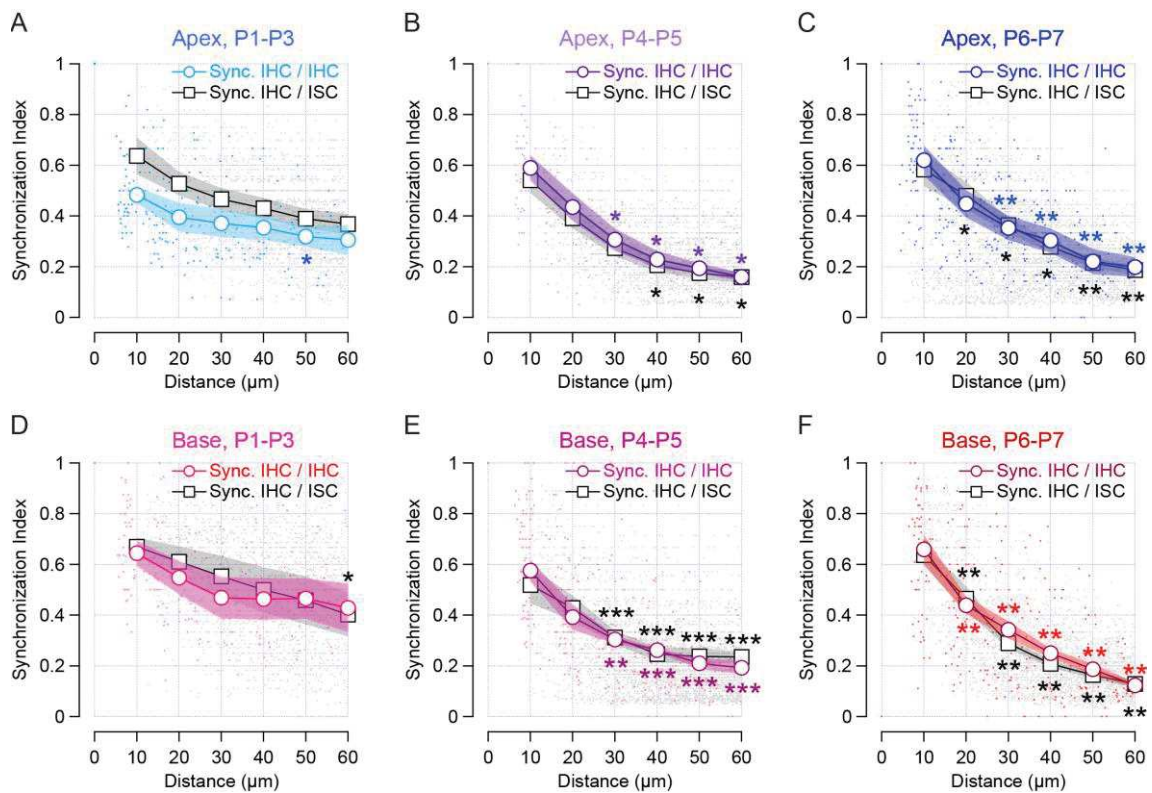


Figure 4.7 : Activité synchrone entre les cellules non-sensorielles et les cellules sensorielles. (A-F) Indice de synchronisation entre les cellules de soutien de l'organe de Kölliker et les cellules sensorielles (points gris) et entre les cellules sensorielles (points colorés) représenté en fonction de la distance les séparant. Les cercles et carrés blancs indiquent respectivement la moyenne de l'activité synchrone entre cellules ciliées internes et entre cellules sensorielles et non sensorielles. (**A-C**) : tour apical et (**D-F**) tour basal. (**A, D**) P1-P3, (**B, E**) P4-P5 (**C, F**) P6-P7. Nombre de cochlées examinées : P1-P3 base : 5, P1-P3 apex : 4 ; P4-P5 base : 8, P4-P5 apex : 3 ; P6-P7 base : 6, P6-P7 apex : 7.

4.5. Activité synchrone des cellules ciliées et cellules de soutien

La forte activité calcique que nous avons observée au sein de la grande crête épithéliale nous a amené à nous intéresser à l'activité synchrone entre les cellules ciliées internes et les cellules de soutien de l'organe du Kölliker. En effet, parallèlement à l'élévation de calcium

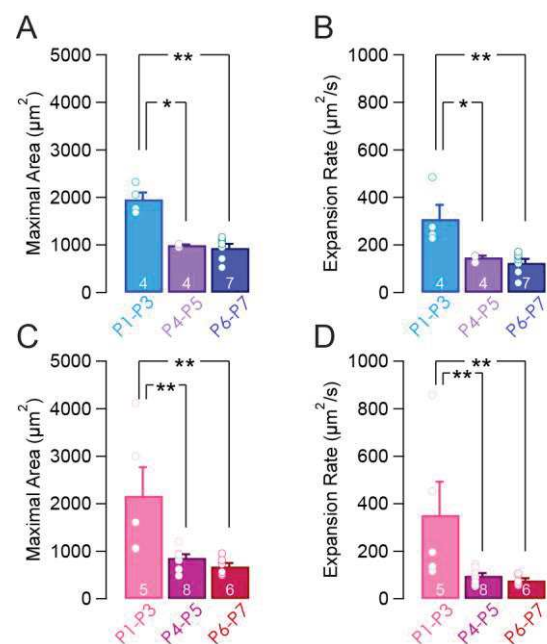
intracellulaire au sein des cellules sensorielles, l'activité de l'organe du Kölliker se caractérise par des vagues calciques qui se propagent au travers des cellules de soutien. Ici encore, nous avons observé que les cellules sensorielles et les cellules de soutien les plus proches, probablement les cellules de bord, tendent à avoir une activité synchrone d'environ 60%. Entre les cellules ciliées et cellules de soutien du tour apical, l'indice de synchronisation pour une distance de 10 μm , SI_{10} , est de 0.64 ± 0.07 et 0.58 ± 0.07 aux stades P1-P3 et P6-P7, respectivement (**Fig 4.7 A-F**). De la même façon, l'activité synchrone entre les cellules ciliées et cellules de soutien du tour basal est élevée, avec un SI_{10} d'environ 0.67 ± 0.04 et 0.64 ± 0.04 aux stades respectifs de P1-P3 et P6-P7 (**Fig 4.7 A-F**). A l'inverse, on notait une faible activité synchrone entre les cellules ciliées internes et les cellules de soutien spatialement éloignées. Dans le tour apical, l'index de synchronisation pour une distance de 70 μm , SI_{70} , est de 0.34 ± 0.04 et 0.17 ± 0.01 aux stades respectifs de P1-P3 et P6-P7. Dans le tour basal, on notait un SI_{70} de 0.35 ± 0.07 et 0.11 ± 0.02 aux stades P1-P3 et P6-P7, respectivement (**Fig 4.7 A-F**). L'ensemble de ces données démontre que les cellules de soutien proches des cellules sensorielles ont une activité synchrone qui tend à rapidement diminuer avec la distance.

Au cours de la première semaine post-natale, on notait une activité coordonnée sur de plus grandes distances après la naissance (P1-P3) en comparaison avec la fin de la première semaine post-natale (P6-P7) aussi bien dans le tour apical que dans le tour basal de la cochlée. L'activité des CCI étant associée aux vagues calciques se propageant dans les cellules de soutien de l'organe de Kölliker, nous avons alors mesuré l'activité des cellules soutien au cours de la première semaine post-natale (**Fig 4.8**). En accord avec un indice de synchronisation pratiquement conservé sur de grandes distances, la taille maximale et la vitesse d'expansion des vagues au sein des cellules de soutien du Kölliker étaient plus élevées au stade P1P3 dans le tour apical (aire maximale $2118.4 \pm 140.3 \mu\text{m}^2$ et $993.1 \pm 84 \mu\text{m}^2$ respectivement à P1P3 et

P6P7 ; $p=0.004$ et vitesse d'expansion $329.7 \pm 57 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $131.7 \pm 18.8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ respectivement à P1P3 et P6P7 ; $p=0.004$, **Fig 4.8 A, B**) ainsi que dans le tour basal de la cochlée (aire maximale, $2415.7 \pm 656.9 \mu\text{m}^2$ et $680.4 \pm 75.6 \mu\text{m}^2$ respectivement à P1P3 et P6P7, $p=0.0028$; vitesse d'expansion $378.5 \pm 142.6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $77.6 \pm 8.9 \mu\text{m}^2/\text{s}$ respectivement à P1P3 et P6P7, $p=0.0028$, **Fig 4.8 C, D**). Ainsi, ces résultats suggèrent un raffinement de la coordination entre les cellules sensorielles et non-sensorielles au cours de la première semaine post-natale.

Figure 4.8 : Surface maximale et vitesse d'expansion des vagues calciques au sein de l'organe de Kölliker au cours du développement.

Surface maximale (**A, C**) et vitesse d'expansion (**B, D**) des vagues de calcium intracellulaire au sein de l'organe de Kölliker issu de tour apical (en haut, bleu) et basal (en bas, rouge) durant la première semaine post-natale. $**p<0.01$ et $*p<0.05$. Le nombre de cochlées étudiées est indiqué dans chaque histogramme.



Nous avons ensuite comparé l'indice de synchronisation des cellules sensorielles entre elles le long du gradient base-apex (**Fig 4.9 A**). A l'exception du SI_{10} à P1P3 (SI_{10} apex = 0.48 ± 0.03 vs SI_{10} base = 0.64 ± 0.05 , $p=0.0085$), l'indice de synchronisation entre les cellules sensorielles est comparable le long de l'axe tonotopique. De la même façon, à l'exception des indices de synchronisation mesurés à P6-P7 pour des distances entre 30 et 70 μm , l'indice de synchronisation entre les CCI et les cellules de soutien est similaire le long du gradient base-apex de la cochlée (**Fig 4.9 B**).

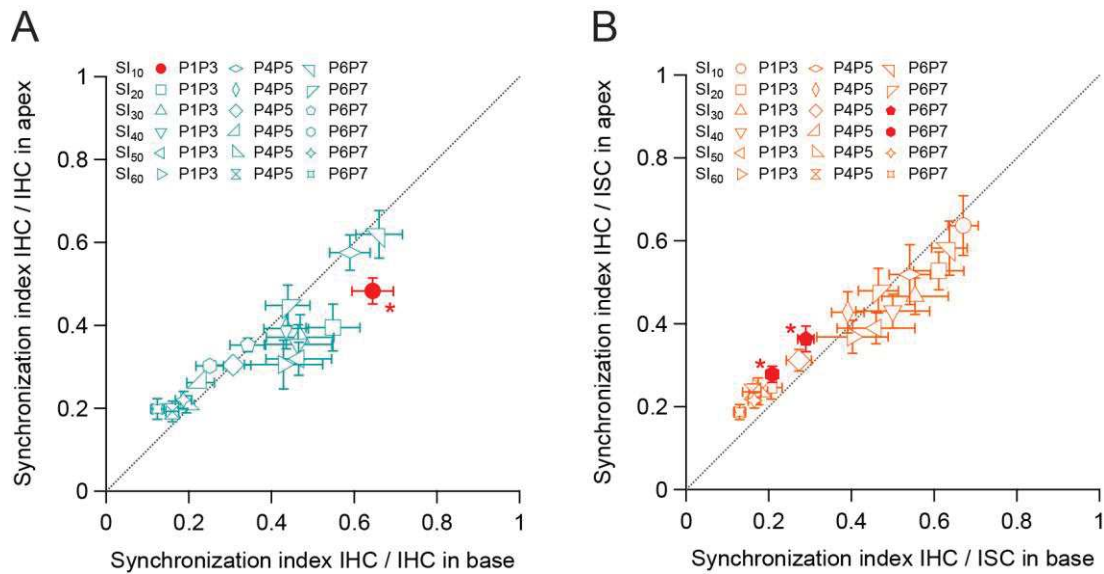


Figure 4.9 : Synchronisation des transitoires calciques entre les cellules sensorielles et les cellules non-sensorielles selon l'axe tonotopique. (A) Indice de synchronisation entre les cellules sensorielles issues du tour apical représenté en fonction de l'indice de synchronisation entre les cellules sensorielles issues du tour basal. **(B)** Indice de synchronisation entre les cellules de soutien de l'organe de Kölliker et les cellules sensorielles issues du tour apical représenté en fonction de l'indice de synchronisation entre les mêmes cellules issues du tour basal. * $p < 0.05$. Les valeurs significativement différentes sont mises en évidence en rouge. Les indices de synchronisation représentés vont de 10 à 70 μm de distance (de SI₁₀ à SI₇₀). Nombre de cochlées examinées : P1-P3 base : 5, P1-P3 apex : 4 ; P4-P5 base : 8, P4-P5 apex : 3 ; P6-P7 base : 6, P6-P7 apex : 7.

4.6. Rôle des cellules de soutien phalangiennes

Nos résultats suggèrent que l'activité des CCI est fortement similaire le long de l'axe tonotopique, en accord avec les résultats de [Sendin et al., 2014](#). Cependant, la comparaison entre nos résultats et ceux obtenus précédemment en patch-clamp pour chaque stade étudié, à savoir P1-P3, P4-P5 et P6-P7, montrait des différences entre les deux méthodes d'exploration fonctionnelle (voir [Sendin et al., 2014](#)). Ainsi, le taux de décharge des trains de potentiels d'action est légèrement inférieur à la fréquence des pics calciques (**Fig 4.10 A**). De plus, la distribution des points correspondant à la durée des trains de potentiels d'action en fonction de celles des transitoires calciques dévie fortement de la régression linéaire (**Fig 4.10 B**). À l'inverse, les CV mesurés à partir de l'intervalle entre les trains de potentiels d'action sont comparables aux CV mesurés à partir de l'intervalle entre les pics calciques (**Fig 4.10 B**). Ces résultats indiquent donc une différence notable quant à la durée des événements entre l'enregistrement de l'activité électrique et l'imagerie calcique.

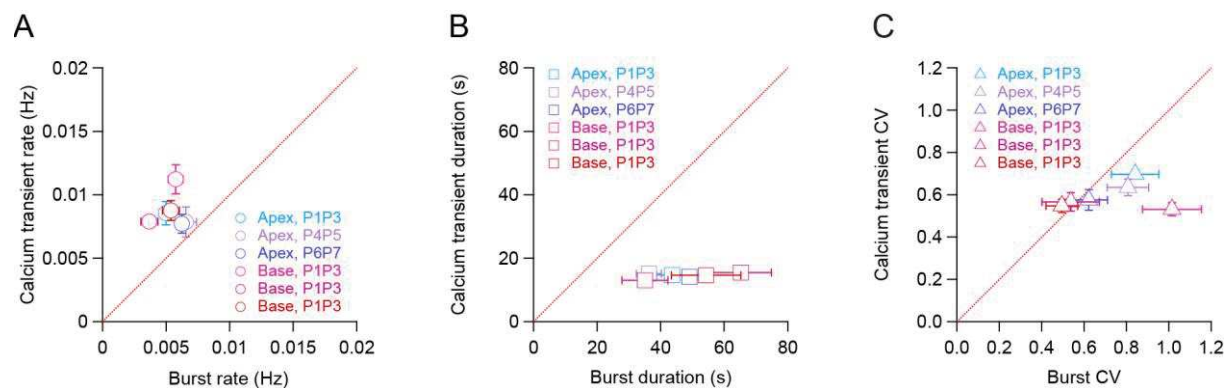


Figure 4.10 : Comparaison de l'activité des CCI obtenue en patch-clamp en fonction de l'activité mesurée à partir de l'imagerie calcique. (A) Taux de décharge des bouffées de potentiels d'action représenté en fonction de la fréquence des transitoires calciques. **(B)** Durée des bouffées de potentiels d'action représentée en fonction des durées des élévations de calcium transitoires. **(C)** CV obtenus à partir de l'intervalle entre les trains de potentiels d'action représentés en fonction des CV des transitoires calciques. Les fréquences, CV et durées des bouffées de potentiels d'action sont issues de [Sendin et al., 2014](#).

Une différence majeure entre les deux approches repose sur la destruction mécanique des cellules de soutien phalangiennes. En effet, l'enregistrement des cellules ciliées internes en patch-clamp nécessite un contact direct entre la pipette de verre et la membrane plasmique. Il est donc nécessaire d'enlever les cellules de soutien qui se situent du côté des piliers, à savoir les cellules de soutien phalangiennes. A l'inverse, la diffusion de la sonde calcique dans les cellules sensorielles ne requiert pas l'ablation des cellules de soutien phalangiennes. Afin de savoir si la présence de ces cellules de soutien est à l'origine de la différence de durée, nous avons comparé l'activité des cellules ciliées internes en imagerie calcique avec et sans cellules de soutien. Nos résultats montrent que l'ablation des cellules de soutien phalangiennes ne modifie pas substantiellement l'activité des cellules ciliées internes (**Fig 4.11 A, B, C et D**). En effet, la fréquence et le CV n'étaient pas significativement altérés en absence des cellules de soutien phalangiennes. Malgré une augmentation significative de la durée des élévations calciques transitoires, cette dernière restait inférieure à la durée des potentiels d'action enregistrés en patch-clamp. De plus, l'activité des vagues calciques dans l'organe de Kölliker ne semble pas affectée par l'absence des CPI. Effectivement, quelles que soient les conditions, la fréquence, la surface maximale et la vitesse d'expansion des vagues de l'organe de Kölliker ne sont pas modifiées en à l'absence des CPI (**Fig 4.11 E, F, G et H**).

Cependant, l'ablation des CPI altère l'indice de synchronisation des CCI entre elles ou bien entre les cellules sensorielles et non-sensorielles (**Fig 4.11 I et J**). Ainsi, on note une réduction de l'indice de synchronisation sans CPI pour les cellules sensorielles voisines ($SI_{10} = 0.62 \pm 0.06$ et $SI_{10} = 0.38 \pm 0.05$ respectivement en présence ou en absence des CPI, $p = 0.0093$). De la même façon, l'indice de synchronisation est fortement diminué entre les cellules sensorielles et non-sensorielles ($SI_{10} = 0.58 \pm 0.07$, $SI_{20} = 0.48 \pm 0.05$ et $SI_{10} = 0.34 \pm 0.06$, $SI_{20} = 0.32 \pm 0.05$ respectivement en présence ou en absence des CPI, pour SI_{10} $p = 0.014$ et pour SI_{20} $p = 0.022$). L'ensemble de ces résultats suggère que les CPI favorisent la coordination des

cellules sensorielles entre elles, probablement en assurant le transfert de second messenger et/ou participant à la sécrétion locale de KCl.

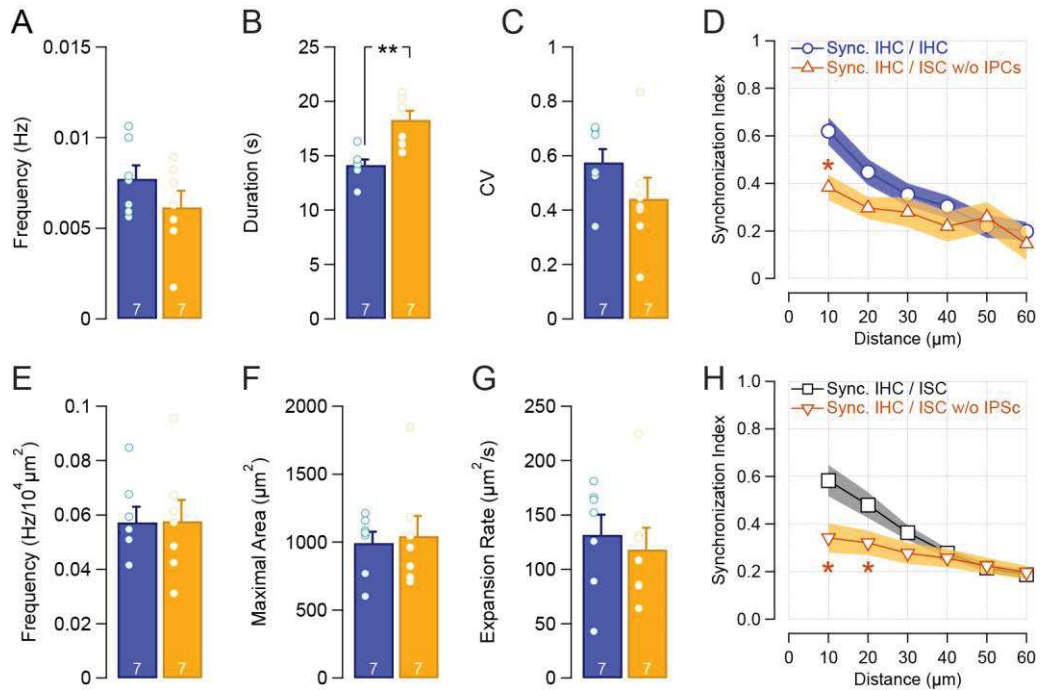


Figure 4.11 : Activité des CCI et de l'organe de Kölliker suite à l'ablation mécanique des cellules de soutien phalangiennes. (A) Fréquence, **(B)** durée et **(D)** coefficient de variation des élévations de calcium transitoires dans les cellules ciliées internes en présence (à gauche, bleu) ou en absence (à droite, orange) des cellules de soutien phalangiennes. **(E)** Fréquence, **(F)** surface maximale et **(G)** vitesse d'expansion des vagues calciques au sein de l'organe de Kölliker en présence (à gauche, bleu) ou en absence (à droite, orange) des cellules de soutien phalangiennes. **(D)** Indice de synchronisation entre les cellules sensorielles représenté en fonction de la distance les séparant en présence (bleu) ou en absence (orange) des CPI et **(H)** indice de synchronisation entre les cellules de soutien de l'organe de Kölliker et les cellules sensorielles représenté en fonction de la distance en présence (noir) et en absence (orange) des CPI. ** $p < 0.01$ et * $p < 0.05$. Nombre de cochlées étudiées : P6P7 apex avec CPI : 7, P6P7 apex sans CPI : 7.

4.7. Activité calcique dépendante de l'ATP

L'ATP est responsable de l'élévation de calcium intracellulaire et de la propagation des vagues calciques dans la cochlée immature (Anselmi *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2011; Tritsch and Bergles, 2010; Tritsch *et al.*, 2007). En accord avec les études précédentes, l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ évoqué par l'ATP est hautement sensible à l'utilisation d'ecto-nucléotidases (Anselmi *et al.*, 2008; Tritsch *et al.*, 2007). Par conséquent, nous avons testé l'effet de l'apyrase, qui hydrolyse l'ATP extracellulaire, sur les vagues calciques spontanées au sein de l'organe de Kolliker (**Fig 4.12 A, B**). L'apyrase a été appliquée durant 30 minutes et les changements calciques ont été enregistrés durant les 10 dernières minutes d'incubation. Les expériences contrôles ont été réalisées suivant le même protocole, à savoir une incubation de l'explant cochléaire pendant 30 minutes avec une solution Ringer et l'enregistrement de l'activité calcique pendant les 10 dernières minutes (**Fig 4.12 E, F**).

L'incubation de 50 ou 100 U/ml d'apyrase de 20 à 30 minutes n'altère pas la fréquence des vagues calciques spontanées dans l'organe de Kolliker (respectivement pour les explants contrôles et traités à l'apyrase, fréquence : 4.9 ± 0.6 Hz/ $10^6 \mu\text{m}^2$ vs 5.9 ± 0.9 Hz/ $10^6 \mu\text{m}^2$). En revanche, la taille et la vitesse des vagues calciques sont affectées en présence d'apyrase (respectivement pour les explants contrôles et incubés avec de l'apyrase, surface de l'aire maximale : $953.4 \pm 116.2 \mu\text{m}^2$ vs $619.3 \pm 55.3 \mu\text{m}^2$, $p=0.014$; vitesse d'expansion : $133.9 \pm 20.4 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ vs $64.6 \pm 7.9 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $p=0.002$; **Fig 4.12 C, D**). Pour confirmer l'efficacité de l'apyrase, nous avons mesuré l'augmentation de calcium dans l'organe de Kolliker en réponse à une application exogène d'ATP à la fin des sessions d'enregistrement (**Fig 4.12 E, F**). Une brève application de $100 \mu\text{M}$ d'ATP évoque une augmentation massive de $[Ca^{2+}]_i$ qui se propage au travers des cellules sensorielles et non sensorielles (surface de l'aire maximale : $3747.6 \pm 717.5 \mu\text{m}^2$ et vitesse d'expansion : $531.7 \pm 148 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; **Fig 4.12 G, H**). Cependant, l'incubation de l'organe de Corti pendant 20 minutes avec 50 ou 100 U/ml d'apyrase prévient la propagation de

la vague calcique évoquée par l'ATP (surface de l'aire maximale : $1385.6 \pm 200.8 \mu\text{m}^2$, $p=9.10^{-5}$ et vitesse d'expansion : $153.7 \pm 30.9 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $p=7.10^{-5}$; **Fig 4.12 G, H**). Ces résultats indiquent donc que la propagation des vagues spontanées et évoquées par l'ATP, est dépendante de la libération d'ATP par les cellules de soutien de l'organe de Kölliker.

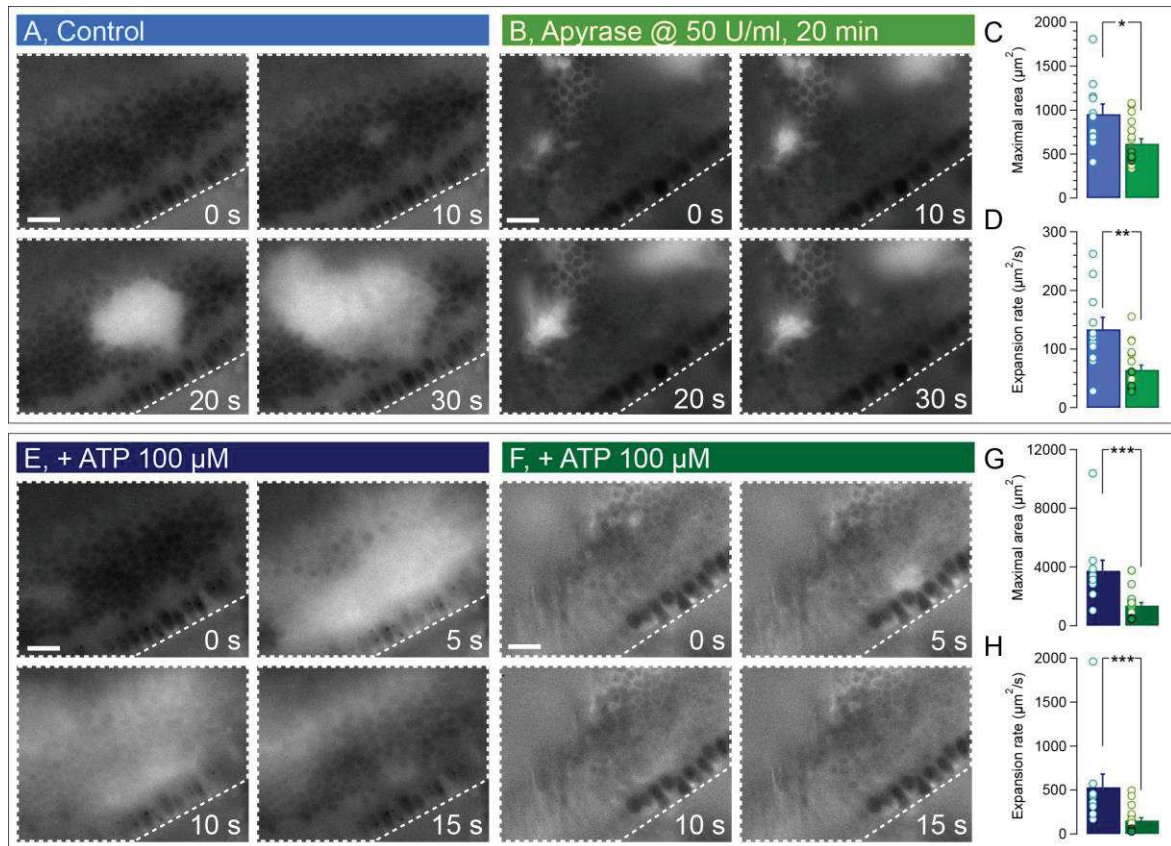


Figure 4.12 : La déplétion de l'ATP extracellulaire prévient la propagation des vagues calciques au sein de l'organe de Kölliker. (A-B) Propagation de vagues calciques spontanées en condition contrôle (A) et suite à l'incubation d'apyrase à 50 U/ml pendant 20 minutes (B). (C-D) surface maximale (C) et vitesse d'expansion (D) des vagues calciques observées au sein de la région d'intérêt indiquée en pointillés blancs en (A) et (B). Barre d'échelle : 10 μm . (E-F) Propagation de vagues calciques évoquées par l'application de 100 μM d'ATP sur les cellules de soutien phalangiennes en condition contrôle (E) et suite à l'incubation d'apyrase à 50 U/ml pendant 30 minutes (F). (G-H) surface maximale (G) et vitesse d'expansion (H) des vagues calciques observées au sein de la région d'intérêt indiquée en pointillés blancs en (E) et (F). Contrôle : bleu ; Apyrase : vert. Pour les moyennes obtenues en présence d'apyrase, les cercles blancs représentent les valeurs avec 50 U/ml d'apyrase et les cercles verts représentent les valeurs avec 100 U/ml d'apyrase.

4.8. Activité calcique indépendante de l'ATP

Malgré la forte dépendance des vagues calciques à l'ATP extracellulaire, le rôle excitateur ou inhibiteur de l'ATP sur l'activité des cellules sensorielles reste débattu (Johnson *et al.*, 2011; Sendin *et al.*, 2014). Nous avons donc mesuré les transitoires calciques des cellules sensorielles, indice de leur activité électrique, en présence d'apyrase (Fig 4.13). Les cellules sensorielles émettent 1 à 10 pics calciques (respectivement pour les explants contrôles et traités à l'apyrase, fréquence : 0.009 ± 1.10^{-3} Hz vs 0.007 ± 5.10^{-4} Hz, Fig 4.13 A, B et D). En présence d'apyrase, les transitoires calciques sont comparables à ceux émis en condition contrôle à l'exception d'une faible augmentation de leur durée (respectivement pour les contrôles et traitées à l'apyrase, amplitude : 0.048 ± 0.01 AU vs 0.043 ± 0.01 AU, CV : 0.46 ± 0.05 vs 0.39 ± 0.04 et durée : 13.1 ± 0.6 s vs 15.9 ± 0.6 , $p=0.004$, Fig 4.13 C, E et F).

Malgré l'altération des vagues calciques dans les cellules de soutien de l'organe du Kölliker, l'activité synchrone entre les CCI et les cellules de soutien proximales n'est pas affectée suite à la déplétion de l'ATP extracellulaire (Contrôle : SI_{10} , 0.6 ± 0.05 , apyrase : SI_{10} , 0.62 ± 0.05 ; Fig 4.13 G). Cependant, on notait une diminution de l'indice de synchronisation entre les CCI et les cellules de soutien éloignées (Contrôle : SI_{60} , 0.17 ± 0.02 , traitées à l'apyrase : SI_{60} , 0.1 ± 0.01 , $p=0.037$, Fig 4.13 G). Cette diminution pourrait être due à la réduction de la surface des vagues calciques dans les cellules de soutien. Enfin, l'apyrase ne modifie pas l'indice de synchronisation entre les CCI voisines (Contrôle : SI_{10} , 0.6 ± 0.06 et traitées à l'apyrase : SI_{10} , 0.67 ± 0.04 ; Fig 4.13 H), mais une meilleure synchronisation est observée au-delà de 60 μm de distance entre les CCI, en raison de l'augmentation de la durée des transitoires calciques (Contrôle : SI_{70} , 0.07 ± 0.03 et traitées à l'apyrase : SI_{70} , 0.16 ± 0.04 , $p=0.047$; Fig 4.13 G).

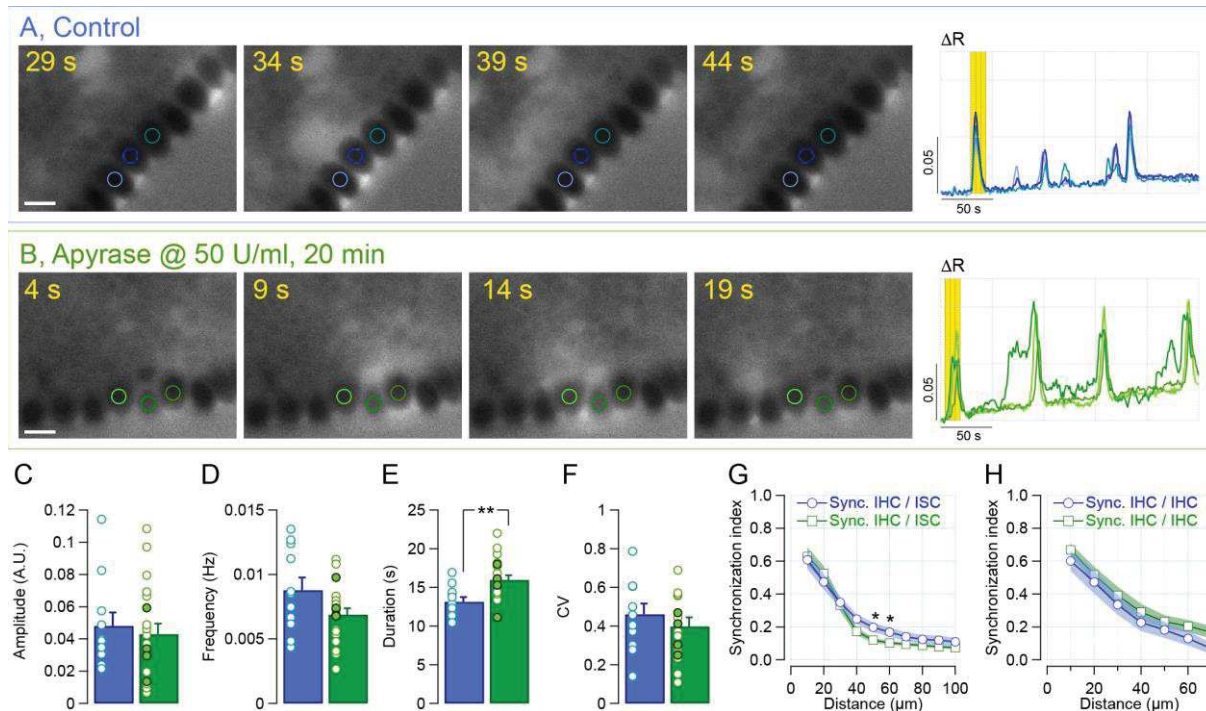


Figure 4.13 : La déplétion de l'ATP extracellulaire n'altère pas l'activité des cellules ciliées internes. (A-B) Exemples représentatifs d'élévations transitoires et spontanées de calcium intracellulaire dans les CCI en condition contrôle (A) et suite à l'incubation d'apyrase à 50 U/ml pendant 20 minutes (B). Barre d'échelle : 10 μm . Les variations du ratio de fluorescence (ΔR) sont mesurées à partir des 3 CCI adjacentes de (A) et (B). La zone délimitée en jaune correspond aux images montrées en (A) et (B). Les régions d'intérêt sont indiquées par des ronds colorés sur les CCI. (C-F) Amplitude (C), fréquence (D), coefficient de variation (E) et durée (F) des élévations de calcium transitoires dans les cellules ciliées internes (contrôle, bleu et apyrase, vert). Pour les moyennes obtenues en présence d'apyrase, les cercles blancs représentent les valeurs avec 50 U/ml d'apyrase et les cercles verts représentent les valeurs avec 100 U/ml d'apyrase. (G-H) Indice de synchronisation entre les cellules sensorielles et les cellules de soutien (G) et entre les cellules sensorielles voisines (H) représenté en fonction de la distance les séparant.

L'ensemble de nos résultats suggère donc une activité hétérogène au sein de la cochlée immature suite à la déplétion de l'ATP extracellulaire. En condition contrôle, l'activité calcique est robuste au sein des cellules de soutien (0.08 ± 0.005 A.U. à $40 \mu\text{m}$ de distance des CCI) ainsi que dans la région à proximité des cellules sensorielles (0.08 ± 0.007 A.U. au niveau des CCI, **Fig 4.14 A**). Cependant, dans les cochlées incubées avec 50 ou 100 U/ml d'apyrase, une réduction significative de l'activité est observée au sein des cellules de soutien, *i.e.*, au-delà d'une distance radiale de $30 \mu\text{m}$ par rapport aux CCI (0.02 ± 0.002 A.U. à $40 \mu\text{m}$ de distance des CCI, $p=0.00015$, **Fig 4.14 B**). En revanche, une forte activité est toujours observée dans la région des CCI (0.1 ± 0.008 A.U. au niveau des CCI, $p=0.66$, **Fig 4.14 B**). L'ensemble de ces résultats suggère que l'activité des cellules de soutien distales dépend de l'ATP extracellulaire, à l'inverse de l'activité des CCI et de leurs cellules de soutien voisines.

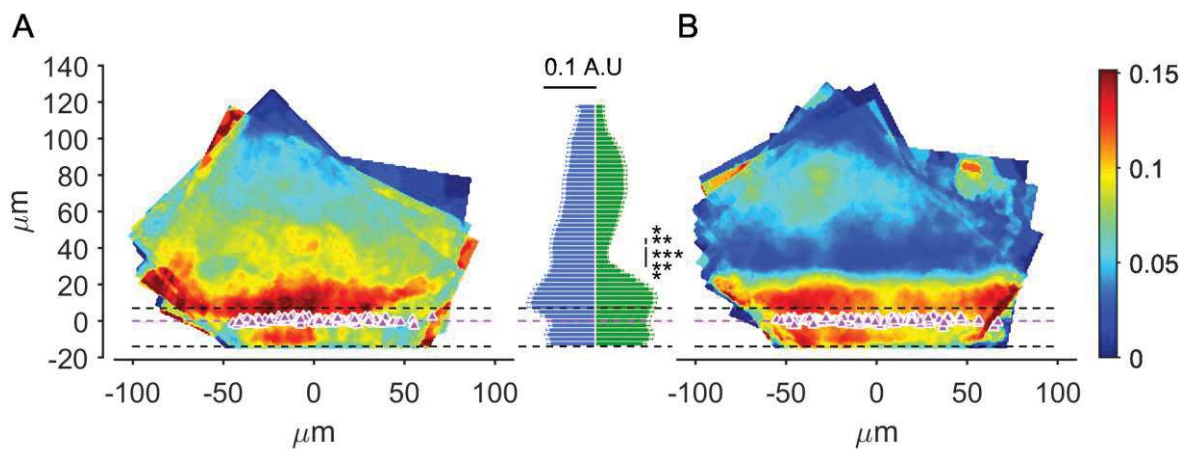


Fig. 4.14 : Activité calcique cumulée dans l'organe de Corti immature en fausses couleurs. (A, B) Pour chaque explant, les vagues calciques observées sur une période de 10 minutes ont été projetées sur un seul plan. Les échantillons ont ensuite été alignés par rapport au barycentre des ROIs des CCI (triangles violets) puis surimposés les uns sur les autres. L'activité calcique, représentée selon l'échelle de couleur à droite, correspond à la moyenne du ratio $f350/f380$. **(A)** Contrôle (bleu) et **(B)** après 20 minutes d'incubation de 50 ou 100 U/ml d'apyrase (vert). Les lignes pointillées noires représentent les limites supérieure et inférieure des CCI. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ et *** $p<0.001$. Nombre de

tours cochléaires contrôle : 11 (5 basal and 6 apical, âge : P4-P7). Nombre de tours cochléaires incubées avec de l'apyrase : 19 (8 basal and 11 apical, âge : P4-P7).

Discussion & Perspectives

Nous avons montré que l'activité des cellules ciliées internes au cours du développement se caractérise par des élévations de calcium intracellulaire transitoires, correspondants à l'émission de trains de potentiels d'action calciques. Le profil de cette activité est comparable entre le tour basal et le tour apical de la cochlée et les cellules sensorielles et non-sensorielles adjacentes montrent une activité synchrone.

5.1. Les élévations calciques transitoires des cellules ciliées internes : miroir des trains de potentiels d'action

Au cours des deux premières semaines post-natales, les cellules ciliées internes émettent des trains de potentiels d'action calciques séparés par de longues périodes de silence (Nouvian *et al.*, 2015; Sendin *et al.*, 2014). Dans notre étude, les élévations de calcium intracellulaire transitoires dans les cellules ciliées internes rappellent l'émission des trains de PA. Ainsi, la fréquence et la distribution temporelle de ces pics calciques sont comparables à celles de l'activité électrique enregistrée en patch perforé (Sendin *et al.*, 2014). Cependant, la durée des pics calciques (environ 15 sec) est plus courte que celle des trains de PA mesurés en patch clamp (environ 50 sec ; Sendin *et al.*, 2014). Au cours du développement, les CCI sont innervées par des fibres efférentes cholinergiques. Ces dernières secrètent de l'acétylcholine et activent ainsi les canaux nicotiques $\alpha 9\alpha 10$ perméables au calcium (Glowatzki, 2000; Katz, 2004; Roux *et al.*, 2011). Les transitoires calciques mesurés dans nos expériences pourraient donc refléter l'influx de calcium au travers des récepteurs nicotiques et non les bouffées de potentiels d'action. Cependant, la durée des potentiels post-synaptiques inhibiteurs, reflétant le couplage des récepteurs nicotiques et les canaux potassiques SK2 ont une durée de l'ordre de la centaine de millisecondes, c'est-à-dire ayant une différence de deux ordres de magnitude par rapport à la durée des transitoires calciques. De plus, notre fréquence d'échantillonnage étant

de 1 Hz, il est peu probable que l'activation des récepteurs nicotiques puisse être détectée dans nos expériences.

La mesure de l'activité électrique des cellules ciliées avec la technique du patch-clamp nécessite un accolement étroit entre la membrane plasmique et la pipette de patch-clamp, et par conséquent, une accessibilité à la membrane plasmique. Dans nos enregistrements en patch-clamp, les cellules phalangiennes internes (CPI), qui sont les cellules de soutien faisant face aux cellules du pilier interne et qui entourent les cellules ciliées internes, sont mécaniquement enlevées ce qui nous permet d'accéder à la membrane plasmique des cellules sensorielles. A l'inverse, dans nos expériences d'imagerie calcique, les cellules phalangiennes internes ne sont pas enlevées. Ainsi, les CPI pourraient réguler la durée des transitoires calciques au sein des CCI. Si l'absence des CPI augmente la durée des élévations transitoires du calcium intracellulaire, ces dernières ont une durée qui reste inférieure à celle des bouffées de potentiels d'action mesurées en patch-clamp. La légère augmentation de la durée des pics calciques pourrait s'expliquer par une recapture du KCl par les CPI. En accord avec cette hypothèse, ces cellules expriment fortement le transporteur KCC4 impliqué dans la recapture du potassium (Boettger *et al.*, 2002). Les enregistrements de patch-clamp pourraient donc modifier le comportement des cellules. Au cours de la période de perforation, les CCI sont maintenues à un potentiel hyperpolarisé (-74 mV), avant de passer en configuration courant-imposé. A ce potentiel, l'inactivation des canaux calciques est négligeable, ce qui permettrait que tous les canaux calciques soient engagés dans l'activité électrique de la cellule. Le recrutement de l'ensemble des canaux calciques pourrait se traduire non seulement par une élévation de décharge importante au début des enregistrements de patch-clamp mais aussi par des trains de potentiels d'action de longue durée (Sendin *et al.*, 2014).

5.2. Le profil d'activité des CCI le long du gradient base-apex

L'activité spontanée dans les organes sensoriels a été proposée comme nécessaire à la consolidation des synapses le long des voies sensorielles ascendantes (Meister *et al.*, 1991; Wong and Oakley, 1996). Dans la modalité auditive, le profil de décharge des fibres du nerf auditif, permet de raffiner la carte tonotopique au niveau des centres supérieurs (Clause *et al.*, 2014). Comme l'activation des fibres du nerf auditif est tributaire de l'activité des cellules ciliées internes (Wong *et al.*, 2013), l'activité des cellules sensorielles devrait donc être un déterminant clé dans ce processus de maturation des centres supérieurs auditifs. Deux mécanismes principaux peuvent être mis en jeu pour la spécification de l'axe tonotopique dans les noyaux de la voie auditive ascendante. Dans un premier scénario, les cellules sensorielles apicales ou basales, ont des profils d'activité différents : les cellules ciliées apicales émettent des trains de potentiels d'action tandis que les cellules ciliées basales émettent des potentiels d'action de façon continue (Johnson *et al.*, 2011). Dans cette hypothèse, les noyaux des centres auditifs supérieurs recevant une entrée discontinue se différencieront pour coder des sons graves tandis que ceux recevant une information continue se spécialiseront dans le codage des sons aigus. Alternativement, l'activité des cellules sensorielles pourrait être quasi similaire de la base à l'apex, et la mise en place de l'axe tonotopique dans les centres supérieurs dépendrait de l'activation synchrone de cellules ciliées adjacentes (Sendin *et al.*, 2014; Tritsch and Bergles, 2010). Nous avons montré que les CCI montrent un comportement semblable de la base à l'apex ainsi qu'une forte activité synchrone entre CCI proches. En accord avec ces résultats, les cellules ciliées internes voisines montrent une activité similaire mesurée à partir de courants entrants, qui ont été attribués à l'activation des récepteurs purinergiques (Tritsch and Bergles, 2010; Tritsch *et al.*, 2007). Cependant, nos résultats montrent une diminution très rapide de l'index de synchronisation entre les CCI avec la distance par rapport aux précédentes études (Tritsch and Bergles, 2010). Cette différence pourrait être expliquée par le critère de seuil établi dans notre

étude, qui exclut les petites variations calciques, et qui pourraient correspondre à des courants de petites amplitudes.

Dans notre étude, les expérimentations ont été réalisées à température ambiante pour préserver les échantillons et ainsi pouvoir enregistrer l'activité des cellules sensorielles et non-sensorielles sur de longues périodes de temps (Nouvian, 2007; Sendin *et al.*, 2014). Bien que les conditions de température ambiante puissent modifier la fréquence et la durée des transitoires calciques (Sendin *et al.*, 2014), il est peu probable que cela modifie totalement le comportement naturel des cellules ciliées internes, *i.e.*, passer d'une activité en train de PA à température ambiante à une activité soutenue à température physiologique. En effet, les enregistrements de patch-clamp à température ambiante et température physiologique montrent une activité comparable des cellules ciliées, sous la forme de bouffée de potentiels d'action, quelle que soit leur location le long de l'axe tonotopique (Sendin *et al.*, 2014).

5.3. Activité des CCI et ATP

Tandis que l'activité des CCI est corrélée la plupart du temps à une augmentation de calcium dans les cellules de soutien les plus proches, *i.e.*, les cellules de bord interne, le mécanisme à l'origine de la mobilisation du calcium est encore débattu. L'ATP a été proposé comme le facteur responsable de la libération de calcium à partir des stores internes dans les cellules de soutien adjacentes (Anselmi *et al.*, 2008; Rodriguez *et al.*, 2012; Tritsch *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2015; Eckrich *et al.*, 2018). Ainsi, l'application d'antagonistes purinergiques à large spectre ainsi que la déplétion de l'ATP extracellulaire diminuent l'activité des cellules de soutien de l'organe de Kölliker (Anselmi *et al.*, 2008; Gale *et al.*, 2004; Tritsch and Bergles, 2010; Tritsch *et al.*, 2007). La mobilisation du calcium intracellulaire dans les cellules de soutien provoque ensuite la sécrétion de chlorure de potassium à proximité des cellules ciliées provoquant ainsi leur dépolarisation et l'émission de potentiels d'action (Wang *et al.*, 2015).

Dans nos expériences, la déplétion de l'ATP extracellulaire réduit fortement la taille et l'expansion des vagues calciques spontanées et évoquées au sein des cellules de soutien de l'organe de Kolliker en accord avec les données précédemment publiées dans la littérature adjacentes ([Anselmi et al., 2008](#); [Rodriguez et al., 2012](#); [Tritsch et al., 2007](#); [Wang et al., 2015](#)) ([Tritsch and Bergles, 2010](#)) . Cependant, l'activité au sein des cellules ciliées internes et à proximité de ces dernières reste préservée. Ces résultats pourraient s'expliquer par un gradient de concentration radial d'ATP au sein de l'organe de Kolliker. Ainsi, une faible concentration d'ATP entre les cellules de soutien entrainera la déplétion rapide de l'ATP par l'apyrase et la diminution de l'activité de ces cellules. A l'inverse, une forte concentration d'ATP à proximité des CCI pourrait saturer l'apyrase et ainsi préserver l'activité des CCI. Alternativement, ces résultats suggèrent une activité des CCI indépendante de l'ATP. Ces données sont en accord avec l'émission de trains de potentiels d'action des CCI en présence d'antagonistes purinergiques à large spectre ([Sendin et al., 2014](#)). Si tel est le cas, deux mécanismes pourraient alors coexister au sein de la cochlée en développement : une activité ATP-dépendante pour les cellules de soutien et une activité ATP-indépendante à proximité des cellules ciliées. Cette dernière pourrait être soutenue par la libération de KCl. Si tel est le cas, ces résultats devraient être confirmés à l'aide d'antagonistes purinergiques à large spectre comme le PPADS et la suramine. Cependant, les variations des longueurs d'ondes d'excitation et/ou d'émission lors de l'application de PPADS ou de suramine (données non montrées) empêchent l'utilisation de ces deux composés avec la sonde calcique Fura-2. Aussi, la mesure de l'activité de l'organe de Kolliker avec d'autres sondes calciques (Fluo-3 AM) pourrait contourner cette difficulté. Enfin, une étude récente a démontré la présence de potassium dans les lots d'apyrase ([Madry et al., 2018](#)). La forte concentration d'apyrase purifiée dans les lots utilisés dans nos expériences prédit une faible contamination potassique (voir Fig3.C [Madry et al., 2018](#)). Cependant, l'application aiguë d'apyrase entraîne une légère mais significative augmentation calcique des

CCI, suggérant une dépolarisation de ces dernières (données non montrées). Ainsi, l'activité préservée des CCI en présence d'apyrase pourrait s'expliquer par une dépolarisation soutenue des cellules sensorielles. Si tel est le cas, une activité soutenue devrait être mesurée et non une activité en bouffée. Afin de valider ou non les résultats obtenus avec l'apyrase, des expériences complémentaires seront nécessaires, avec notamment l'utilisation de bloqueurs des récepteurs purinergiques. De plus, la dénaturation de l'apyrase à la chaleur permettra d'obtenir une condition contrôle satisfaisante pour estimer l'action seule de l'apyrase sur l'activité calcique des CCI.

5.4. Perspectives

Afin d'étudier plus en avant l'activité des CCI, nous nous intéresserons à leur modulation par les terminaisons cholinergiques du faisceau olivo-cochléaire. En effet, les cellules ciliées internes immatures sont transitoirement innervées par les efférences médianes cholinergiques. La libération d'acétylcholine hyperpolarise les cellules ciliées en raison du couplage entre le récepteur $\alpha 9\alpha 10$ et le canal potassique SK2. Pour étudier la régulation cholinergique des cellules sensorielles, nous disposons au laboratoire des souris *Hoxb1* conçues par l'équipe du Dr. Michelle Studer ([Di Bonito et al., 2013](#)). Ces souris se caractérisent par l'absence des fibres cholinergiques du faisceau olivo-cochléaire médian (MOC) innervant les CCI immatures. Nos résultats préliminaires obtenus en patch-clamp démontrent l'absence de libération d'acétylcholine (absence de courants postsynaptiques suite à l'application d'une solution riche en potassium) malgré l'expression des récepteurs $\alpha 9\alpha 10$ et du canal SK2 (activation de courants bi-phasiques évoqués par l'application d'acétylcholine) dans les CCI des souris KO *Hoxb1*. Cependant, le nombre limité d'explants utilisés en imagerie calcique ne nous permet pas pour l'instant d'estimer les conséquences de l'absence d'innervation cholinergique sur l'activité des CCI. Nul doute que l'utilisation de ce modèle nous permettra de comprendre plus en détail le

rôle de l'innervation cholinergique dans l'activité des cellules sensorielles au cours du développement.

Références

- Anniko, M., Wroblewski, R., Wersäll, J., 1979. Development of endolymph during maturation of the mammalian inner ear. A preliminary report. *Arch Otorhinolaryngol* 225, 161–163.
- Anselmi, F., Hernandez, V.H., Crispino, G., Seydel, A., Ortolano, S., Roper, S.D., Kessar, N., Richardson, W., Rickheit, G., Filippov, M.A., Monyer, H., Mammano, F., 2008. ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca²⁺ signals across the inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 18770–18775. doi:10.1073/pnas.0800793105
- Babola, T.A., Li, S., Gribizis, A., Lee, B.J., Issa, J.B., Wang, H.C., Crair, M.C., Bergles, D.E., 2018. Homeostatic Control of Spontaneous Activity in the Developing Auditory System. *Neuron* 99, 511–524.e5. doi:10.1016/j.neuron.2018.07.004
- Baig, S.M., Koschak, A., Lieb, A., Gebhart, M., Dafinger, C., Nürnberg, G., Ali, A., Ahmad, I., Sinnegger-Brauns, M.J., Brandt, N., Engel, J., Mangoni, M.E., Farooq, M., Khan, H.U., Nürnberg, P., Striessnig, J., Bolz, H.J., 2011. Loss of Ca(v)1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat Neurosci* 14, 77–84. doi:10.1038/nn.2694
- Becker, L., Schnee, M.E., Niwa, M., Sun, W., Maxeiner, S., Talaei, S., Kachar, B., Rutherford, M.A., Ricci, A.J., 2018. The presynaptic ribbon maintains vesicle populations at the hair cell afferent fiber synapse. *Elife* 7, e30241. doi:10.7554/eLife.30241
- Beltramello, M., Piazza, V., Bukauskas, F.F., Pozzan, T., Mammano, F., 2005. Impaired permeability to Ins(1,4,5)P₃ in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness. *Nat Cell Biol* 7, 63–69. doi:10.1038/ncb1205
- Beutner, D., Moser, T., 2001. The presynaptic function of mouse cochlear inner hair cells during development of hearing. *J Neurosci* 21, 4593–4599.
- Boettger, T., Hübner, C.A., Maier, H., Rust, M.B., Beck, F.X., Jentsch, T.J., 2002. Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter Kcc4. *Nature* 416, 874–878. doi:10.1038/416874a
- Brandt, A., Khimich, D., Moser, T., 2005. Few CaV1.3 channels regulate the exocytosis of a synaptic vesicle at the hair cell ribbon synapse. *J Neurosci* 25, 11577–11585.
- Brandt, A., Striessnig, J., Moser, T., 2003. CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 23, 10832–10840.
- Bulankina, A.V., Moser, T., 2012. Neural circuit development in the mammalian cochlea. *Physiology (Bethesda, Md)* 27, 100–112. doi:10.1152/physiol.00036.2011

- Clause, A., Kim, G., Sonntag, M., Weisz, C.J.C., Vetter, D.E., Rübsamen, R., Kandler, K., 2014. The precise temporal pattern of prehearing spontaneous activity is necessary for tonotopic map refinement. *Neuron* 82, 822–835. doi:10.1016/j.neuron.2014.04.001
- Clause, A., Lauer, A.M., Kandler, K., 2017. Mice Lacking the Alpha9 Subunit of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Exhibit Deficits in Frequency Difference Limens and Sound Localization. *Front Cell Neurosci* 11, 167. doi:10.3389/fncel.2017.00167
- Di Bonito, M., Narita, Y., Avallone, B., Sequino, L., Mancuso, M., Andolfi, G., Franzè, A.M., Puelles, L., Rijli, F.M., Studer, M., 2013. Assembly of the auditory circuitry by a Hox genetic network in the mouse brainstem. *PLoS Genet* 9, e1003249. doi:10.1371/journal.pgen.1003249
- Eckrich, T., Blum, K., Milenkovic, I., Engel, J., 2018. Fast Ca²⁺ Transients of Inner Hair Cells Arise Coupled and Uncoupled to Ca²⁺ Waves of Inner Supporting Cells in the Developing Mouse Cochlea. *Front Mol Neurosci* 11, 264. doi:10.3389/fnmol.2018.00264
- Eckrich, T., Varakina, K., Johnson, S.L., Franz, C., Singer, W., Kuhn, S., Knipper, M., Holley, M.C., Marcotti, W., 2012. Development and function of the voltage-gated sodium current in immature Mammalian cochlear inner hair cells. *PLoS ONE* 7, e45732. doi:10.1371/journal.pone.0045732
- Frank, T., Rutherford, M.A., Strenzke, N., Neef, A., Pangršič, T., Khimich, D., Fejtova, A., Fetjova, A., Gundelfinger, E.D., Liberman, M.C., Harke, B., Bryan, K.E., Lee, A., Egner, A., Riedel, D., Moser, T., 2010. Bassoon and the synaptic ribbon organize Ca²⁺ channels and vesicles to add release sites and promote refilling. *Neuron* 68, 724–738. doi:10.1016/j.neuron.2010.10.027
- Fuchs, P.A., 2014. A “calcium capacitor” shapes cholinergic inhibition of cochlear hair cells. *J Physiol (Lond)* 592, 3393–3401. doi:10.1113/jphysiol.2013.267914
- Fuchs, P.A., Murrow, B.W., 1992. A novel cholinergic receptor mediates inhibition of chick cochlear hair cells. *Proc Biol Sci* 248, 35–40. doi:10.1098/rspb.1992.0039
- Gale, J.E., Piazza, V., Ciubotaru, C.D., Mammano, F., 2004. A mechanism for sensing noise damage in the inner ear. *Curr Biol* 14, 526–529. doi:10.1016/j.cub.2004.03.002
- Géléoc, G.S.G., Holt, J.R., 2003. Developmental acquisition of sensory transduction in hair cells of the mouse inner ear. *Nat Neurosci* 6, 1019–1020. doi:10.1038/nn1120
- Glowatzki, E., Fuchs, P.A., 2002. Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci* 5, 147–154. doi:10.1038/nn796
- Glowatzki, E., Fuchs, P.A., 2000. Cholinergic synaptic inhibition of inner hair cells in the neonatal mammalian cochlea. *Science* 288, 2366–2368.

- Horn, R., Marty, A., 1988. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* 92, 145–159.
- Jean, P., Lopez de la Morena, D., Michanski, S., Jaime Tobón, L.M., Chakrabarti, R., Picher, M.M., Neef, J., Jung, S., Gültas, M., Maxeiner, S., Neef, A., Wichmann, C., Strenzke, N., Grabner, C., Moser, T., 2018. The synaptic ribbon is critical for sound encoding at high rates and with temporal precision. *Elife* 7, 2922. doi:10.7554/eLife.29275
- Johnson, S.L., Adelman, J.P., Marcotti, W., 2007. Genetic deletion of SK2 channels in mouse inner hair cells prevents the developmental linearization in the Ca²⁺ dependence of exocytosis. *J Physiol (Lond)* 583, 631–646. doi:10.1113/jphysiol.2007.136630
- Johnson, S.L., Eckrich, T., Kuhn, S., Zampini, V., Franz, C., Ranatunga, K.M., Roberts, T.P., Masetto, S., Knipper, M., Kros, C.J., Marcotti, W., 2011. Position-dependent patterning of spontaneous action potentials in immature cochlear inner hair cells. *Nat Neurosci* 14, 711–717. doi:10.1038/nn.2803
- Johnson, S.L., Kennedy, H.J., Holley, M.C., Fettiplace, R., Marcotti, W., 2012. The resting transducer current drives spontaneous activity in prehearing Mammalian cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 32, 10479–10483. doi:10.1523/JNEUROSCI.0803-12.2012
- Johnson, S.L., Kuhn, S., Franz, C., Ingham, N., Furness, D.N., Knipper, M., Steel, K.P., Adelman, J.P., Holley, M.C., Marcotti, W., 2013. Presynaptic maturation in auditory hair cells requires a critical period of sensory-independent spiking activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. doi:10.1073/pnas.1219578110
- Johnson, S.L., Marcotti, W., Kros, C.J., 2005. Increase in efficiency and reduction in Ca²⁺ dependence of exocytosis during development of mouse inner hair cells. *J Physiol (Lond)* 563, 177–191. doi:10.1113/jphysiol.2004.074740
- Kamiya, K., Takahashi, K., Kitamura, K., Momoi, T., Yoshikawa, Y., 2001. Mitosis and apoptosis in postnatal auditory system of the C3H/He strain. *Brain Res.* 901, 296–302.
- Katz, E., Elgoyhen, A.B., Gómez-Casati, M.E., Knipper, M., Vetter, D.E., Fuchs, P.A., Glowatzki, E., 2004. Developmental regulation of nicotinic synapses on cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 24, 7814–7820. doi:10.1523/JNEUROSCI.2102-04.2004
- Khimich, D., Nouvian, R., Pujol, R., Tom Dieck, S., Egner, A., Gundelfinger, E.D., Moser, T., 2005. Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature* 434, 889–894. doi:10.1038/nature03418
- Koundakjian, E.J., Appler, J.L., Goodrich, L.V., 2007. Auditory neurons make stereotyped wiring decisions before maturation of their targets. *J Neurosci* 27, 14078–14088. doi:10.1523/JNEUROSCI.3765-07.2007

- Kros, C.J., Ruppersberg, J.P., Rüsç, A., 1998. Expression of a potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice. *Nature* 394, 281–284. doi:10.1038/28401
- Lautermann, J.R., Frank, H.G., Jahnke, K., Traub, O., Winterhager, E., 1999. Developmental expression patterns of connexin26 and -30 in the rat cochlea. *Dev. Genet.* 25, 306–311. doi:10.1002/(SICI)1520-6408(1999)25:4<306::AID-DVG4>3.0.CO;2-R
- Lim, D.J., Anniko, M., 1985. Developmental morphology of the mouse inner ear. A scanning electron microscopic observation. *Acta Otolaryngol Suppl* 422, 1–69.
- Madry, C., Arancibia-Cárcamo, I.L., Kyrargyri, V., Chan, V.T.T., Hamilton, N.B., Attwell, D., 2018. Effects of the ecto-ATPase apyrase on microglial ramification and surveillance reflect cell depolarization, not ATP depletion. *PNAS* 115, 201715354–E1617. doi:10.1073/pnas.1715354115
- Majumder, P., Crispino, G., Rodriguez, L., Ciubotaru, C.D., Anselmi, F., Piazza, V., Bortolozzi, M., Mammano, F., 2010. ATP-mediated cell-cell signaling in the organ of Corti: the role of connexin channels. *Purinergic Signal* 6, 167–187. doi:10.1007/s11302-010-9192-9
- Marcotti, W., 2012. Functional assembly of mammalian cochlear hair cells. *Exp. Physiol.* 97, 438–451. doi:10.1113/expphysiol.2011.059303
- Marcotti, W., Géléoc, G.S., Lennan, G.W., Kros, C.J., 1999. Transient expression of an inwardly rectifying potassium conductance in developing inner and outer hair cells along the mouse cochlea. *Pflugers Arch* 439, 113–122.
- Marcotti, W., Johnson, S.L., Holley, M.C., Kros, C.J., 2003a. Developmental changes in the expression of potassium currents of embryonic, neonatal and mature mouse inner hair cells. *J Physiol (Lond)* 548, 383–400. doi:10.1113/jphysiol.2002.034801
- Marcotti, W., Johnson, S.L., Kros, C.J., 2004. A transiently expressed SK current sustains and modulates action potential activity in immature mouse inner hair cells. *J Physiol (Lond)* 560, 691–708. doi:10.1113/jphysiol.2004.072868
- Marcotti, W., Johnson, S.L., Rusch, A., Kros, C.J., 2003b. Sodium and calcium currents shape action potentials in immature mouse inner hair cells. *J Physiol (Lond)* 552, 743–761. doi:10.1113/jphysiol.2003.043612
- Nouvian, R., 2007. Temperature enhances exocytosis efficiency at the mouse inner hair cell ribbon synapse. *J Physiol (Lond)* 584, 535–542. doi:10.1113/jphysiol.2007.139675
- Nouvian, R., Beutner, D., Parsons, T.D., Moser, T., 2006. Structure and function of the hair cell ribbon synapse. *J Membr Biol* 209, 153–165. doi:10.1007/s00232-005-0854-4

- Nouvian, R., Eybalin, M., Puel, J.-L., 2015. Cochlear efferents in developing adult and pathological conditions. *Cell Tissue Res* 361, 301–309. doi:10.1007/s00441-015-2158-z
- Oliver, D., Knipper, M., Derst, C., Fakler, B., 2003. Resting potential and submembrane calcium concentration of inner hair cells in the isolated mouse cochlea are set by KCNQ-type potassium channels. *J Neurosci* 23, 2141–2149.
- Ortolano, S., Di Pasquale, G., Crispino, G., Anselmi, F., Mammano, F., Chiorini, J.A., 2008. Coordinated control of connexin 26 and connexin 30 at the regulatory and functional level in the inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 18776–18781. doi:10.1073/pnas.0800831105
- Palmer, A.R., Russell, I.J., 1986. Phase-locking in the cochlear nerve of the guinea-pig and its relation to the receptor potential of inner hair-cells. *Hear Res* 24, 1–15.
- Pan, B., Akyuz, N., Liu, X.-P., Asai, Y., Nist-Lund, C., Kurima, K., Derfler, B.H., György, B., Limapichat, W., Walujkar, S., Wimalasena, L.N., Sotomayor, M., Corey, D.P., Holt, J.R., 2018. TMC1 Forms the Pore of Mechanosensory Transduction Channels in Vertebrate Inner Ear Hair Cells. *Neuron* 99, 736–753.e6. doi:10.1016/j.neuron.2018.07.033
- Peng, A.W., Effertz, T., Ricci, A.J., 2013. Adaptation of Mammalian auditory hair cell mechanotransduction is independent of calcium entry. *Neuron* 80, 960–972. doi:10.1016/j.neuron.2013.08.025
- Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., Striessnig, J., 2000. Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell* 102, 89–97.
- Rodriguez, L., Simeonato, E., Scimemi, P., Anselmi, F., Cali, B., Crispino, G., Ciubotaru, C.D., Bortolozzi, M., Ramirez, F.G., Majumder, P., Arslan, E., de Camilli, P., Pozzan, T., Mammano, F., 2012. Reduced phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis impairs inner ear Ca²⁺ signaling and high-frequency hearing acquisition. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 14013–14018. doi:10.1073/pnas.1211869109
- Roux, I., Wersinger, E., McIntosh, J.M., Fuchs, P.A., Glowatzki, E., 2011. Onset of cholinergic efferent synaptic function in sensory hair cells of the rat cochlea. *J Neurosci* 31, 15092–15101. doi:10.1523/JNEUROSCI.2743-11.2011
- Rubel, E.W., Fay, R.R., 2012. *Development of the Auditory System*. Springer Science & Business Media.
- Rudnicki, A., Avraham, K.B., 2012. microRNAs: the art of silencing in the ear. *EMBO Mol Med* 4, 849–859. doi:10.1002/emmm.201100922

- Rutherford, M.A., Pangršič, T., 2012. Molecular anatomy and physiology of exocytosis in sensory hair cells. *Cell Calcium* 52, 327–337. doi:10.1016/j.ceca.2012.05.008
- Saunders, J.C., Doan, D.E., Cohen, Y.E., 1993. The contribution of middle-ear sound conduction to auditory development. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* 106, 7–13.
- Sendin, G., Bourien, J., Rassendren, F., Puel, J.-L., Nouvian, R., 2014. Spatiotemporal pattern of action potential firing in developing inner hair cells of the mouse cochlea. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 1999–2004. doi:10.1073/pnas.1319615111
- Sendin, G., Bulankina, A.V., Riedel, D., Moser, T., 2007. Maturation of ribbon synapses in hair cells is driven by thyroid hormone. *J Neurosci* 27, 3163–3173. doi:10.1523/JNEUROSCI.3974-06.2007
- Simmons, D.D., 2002. Development of the inner ear efferent system across vertebrate species. *J. Neurobiol.* 53, 228–250. doi:10.1002/neu.10130
- Simonneau, L., Gallego, M., Pujol, R., 2003. Comparative expression patterns of T-, N-, E-cadherins, beta-catenin, and polysialic acid neural cell adhesion molecule in rat cochlea during development: implications for the nature of Kölliker's organ. *J Comp Neurol* 459, 113–126. doi:10.1002/cne.10604
- Sun, S., Babola, T., Pregernig, G., So, K.S., Nguyen, M., Su, S.-S.M., Palermo, A.T., Bergles, D.E., Burns, J.C., Müller, U., 2018. Hair Cell Mechanotransduction Regulates Spontaneous Activity and Spiral Ganglion Subtype Specification in the Auditory System. *Cell* 174, 1247–1263.e15. doi:10.1016/j.cell.2018.07.008
- Tritsch, N.X., Bergles, D.E., 2010. Developmental regulation of spontaneous activity in the Mammalian cochlea. *J Neurosci* 30, 1539–1550. doi:10.1523/JNEUROSCI.3875-09.2010
- Tritsch, N.X., Rodríguez-Contreras, A., Crins, T.T.H., Wang, H.C., Borst, J.G.G., Bergles, D.E., 2010. Calcium action potentials in hair cells pattern auditory neuron activity before hearing onset. *Nat Neurosci* 13, 1050–1052. doi:10.1038/nn.2604
- Tritsch, N.X., Yi, E., Gale, J.E., Glowatzki, E., Bergles, D.E., 2007. The origin of spontaneous activity in the developing auditory system. *Nature* 450, 50–55. doi:10.1038/nature06233
- Uziel, A., Legrand, C., Rabie, A., 1985. Corrective effects of thyroxine on cochlear abnormalities induced by congenital hypothyroidism in the rat. I. Morphological study. *Brain Res.* 351, 111–122.
- Uziel, A., Rabie, A., Marot, M., 1980. The effect of hypothyroidism on the onset of cochlear potentials in developing rats. *Brain Res.* 182, 172–175.

- Waguespack, J., Salles, F.T., Kachar, B., Ricci, A.J., 2007. Stepwise morphological and functional maturation of mechanotransduction in rat outer hair cells. *J Neurosci* 27, 13890–13902. doi:10.1523/JNEUROSCI.2159-07.2007
- Wang, H.C., Lin, C.-C., Cheung, R., Zhang-Hooks, Y., Agarwal, A., Ellis-Davies, G., Rock, J., Bergles, D.E., 2015. Spontaneous Activity of Cochlear Hair Cells Triggered by Fluid Secretion Mechanism in Adjacent Support Cells. *Cell* 163, 1348–1359. doi:10.1016/j.cell.2015.10.070
- Weiler, S., Krinner, S., Wong, A.B., Moser, T., Pangršič, T., 2014. ATP Hydrolysis Is Critically Required for Function of CaV1.3 Channels in Cochlear Inner Hair Cells via Fueling Ca²⁺ Clearance. *J Neurosci* 34, 6843–6848. doi:10.1523/JNEUROSCI.4990-13.2014
- Weisz, C., Glowatzki, E., Fuchs, P., 2009. The postsynaptic function of type II cochlear afferents. *Nature* 461, 1126–1129. doi:10.1038/nature08487
- Wong, A.B., Jing, Z., Rutherford, M.A., Frank, T., Strenzke, N., Moser, T., 2013. Concurrent maturation of inner hair cell synaptic Ca²⁺ influx and auditory nerve spontaneous activity around hearing onset in mice. *J Neurosci* 33, 10661–10666. doi:10.1523/JNEUROSCI.1215-13.2013
- Wong, A.B., Rutherford, M.A., Gabrielaitis, M., Pangršič, T., Göttfert, F., Frank, T., Michanski, S., Hell, S., Wolf, F., Wichmann, C., Moser, T., 2014. Developmental refinement of hair cell synapses tightens the coupling of Ca²⁺ influx to exocytosis. *EMBO J* 33, 247–264. doi:10.1002/emboj.201387110
- Zhang-Hooks, Y., Agarwal, A., Mishina, M., Bergles, D.E., 2016. NMDA Receptors Enhance Spontaneous Activity and Promote Neuronal Survival in the Developing Cochlea. *Neuron* 89, 337–350. doi:10.1016/j.neuron.2015.12.016
- Zuo, J., Treadaway, J., Buckner, T.W., Fritsch, B., 1999. Visualization of alpha9 acetylcholine receptor expression in hair cells of transgenic mice containing a modified bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14100–14105.

Article



Spiking Pattern of the Mouse Developing Inner Hair Cells Is Mostly Invariant Along the Tonotopic Axis

Anne-Gabrielle Harrus[†], Jean-Charles Ceccato[†], Gaston Sendin, Jérôme Bourien, Jean-Luc Puel and Régis Nouvian*

Institut des Neurosciences de Montpellier (INM), Inserm, University of Montpellier, Montpellier, France

During development, the sensory cells of the cochlea, the inner hair cells (IHCs), fire spontaneous calcium action potentials. This activity at the pre-hearing stage allows the IHCs to autonomously excite the auditory nerve fibers and hence, represents an efficient mechanism to shape the tonotopic organization along the ascending auditory pathway. Using calcium imaging, we show that the activity in the developing cochlea consists of calcium waves that propagate across the supporting and sensory cells. Both basal and apical IHCs were characterized by similar spontaneous calcium transients interspaced with silent periods, consistent with bursts of action potentials recorded in patch-clamp. In addition, adjacent auditory hair cells tend to have a synchronized $[Ca^{2+}]_i$ activity, irrespective of their location along the base-to-apex gradient of the cochlea. Finally, we show that the mechanical ablation of the inner phalangeal cells (IPCs), a class of supporting cells, reduces the synchronized $[Ca^{2+}]_i$ activity between neighboring sensory cells. These findings support the hypothesis that the tonotopic map refinement in higher auditory centers would depend on the synchronization of a discrete number of auditory sensory cells.

Keywords: cochlea, sensory cells, action potential, calcium transients, spontaneous activity

INTRODUCTION

The auditory sensory cells of the cochlea, the inner hair cells (IHCs), undergo a developmental change from generating action potential to gradual receptor potential (Kros et al., 1998; Beutner and Moser, 2001; Marcotti et al., 2003; Marcotti, 2012). Developing IHCs fire bursts of calcium action potentials in a spontaneous manner (Tritsch et al., 2007; Tritsch and Bergles, 2010; Johnson et al., 2011, 2013; Sendin et al., 2014), while after the onset of hearing (i.e., beginning of the second postnatal week, Mikaelian et al., 1965; Ehret, 1985), the expression of a large-conductance potassium channel prevents the action potential firing and enables the IHCs to generate a receptor potential (Kros et al., 1998). At this stage, IHCs are fully able to translate incoming sound stimulation into glutamate release onto the afferent auditory fibers (Nouvian et al., 2006).

During developmental stages, the secretion of glutamate in response to acoustic cues is not possible because of the immature state of the ear, i.e., closed ear canal and lack of mature endolymph prevent the incoming sound stimulation to activate the sensory hair cells (Anniko et al., 1979; Saunders et al., 1993). The spontaneous spiking activity at the pre-hearing stage allows the IHCs to excite the auditory nerve fibers (Beutner and Moser, 2001; Tritsch et al., 2010; Wong et al., 2013). Thus, it represents a valuable mechanism to specify the sensory neurons identity without

OPEN ACCESS

Edited by:

Michael Reber,
Krembil Research Institute,
University Health Network, Canada

Reviewed by:

Tobias Moser,
Universitätsmedizin Göttingen,
Germany
Ivan Milenkovic,
Leipzig University, Germany
Pascal Darbon,
Université de Strasbourg, France

*Correspondence:

Régis Nouvian
regis.nouvian@inserm.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work

Received: 06 June 2018

Accepted: 22 October 2018

Published: 14 November 2018

Citation:

Harrus A-G, Ceccato J-C, Sendin G,
Bourien J, Puel J-L and Nouvian R
(2018) Spiking Pattern of the Mouse
Developing Inner Hair Cells Is Mostly
Invariant Along the Tonotopic Axis.
Front. Cell. Neurosci. 12:407.
doi: 10.3389/fncel.2018.00407

sound-stimulation (Shrestha et al., 2018; Sun et al., 2018). In addition, the temporal pattern of the developing hair cells activity is crucial for the tonotopic map formation in the nuclei of the higher auditory centers (Clause et al., 2014, 2017). Up to now, two different mechanisms have been proposed to instruct the tonotopic map refinement. In a first scenario, the firing pattern in hair cells varies along the cochlea, i.e., basal and apical IHCs fire in a sustained and burst manner, respectively (Johnson et al., 2011). In this hypothesis, the tonotopic map maturation in the auditory centers would depend on continuous or interrupted inputs that arise from the cochlea. An alternative scenario consists in a homogenous firing pattern along the tonotopic axis (Sendin et al., 2014). In this case, the organization of the higher auditory centers would depend on synchronized activity of limited numbers of neighboring IHCs (Tritsch et al., 2007; Tritsch and Bergles, 2010; Wang et al., 2015). Here, we used calcium imaging in the immature cochlea to gain insight on the pattern of the IHCs spiking activity. Our results show that the IHCs activity pattern is mostly invariant along the tonotopic axis of the cochlea.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Swiss mice ($n = 36$) of either sex (Janvier Labs) were bred and handled in accordance with the animal welfare guidelines 2010/63/EC of the European Communities Council Directive. This study was carried out in accordance with the recommendations of the ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire (Housing Agreement B34-172-36, Experimental Agreement A34-507). The protocol was approved by the Comité d'éthique en expérimentation animale Languedoc-Roussillon N°36 (Project number APAFIS#6235).

Calcium Imaging

After cervical dislocation [postnatal day 1 (P1) to 7 (P7)], apical or basal coils of the cochlea were dissected using the following extracellular solution (in mM): 5.36 KCl, 141.7 NaCl, 1 MgCl₂·6H₂O, 0.5 MgSO₄·7H₂O, 10 HEPES and 10 D-glucose (pH was adjusted to 7.2 with NaOH and the solution had an osmolarity between 290 mosmol/l and 310 mosmol/l). The preparation was then continuously superfused with an extracellular solution containing (in mM): 144 NaCl, 1.3 CaCl₂, 5.8 KCl, 0.9 MgCl₂, 10 HEPES, and 10 D-glucose (pH was adjusted to 7.2 with NaOH and the extracellular solution had an osmolarity between 290 mosmol/l and 310 mosmol/l). All chemicals were obtained from Sigma. To enable a better loading of the calcium dye inside the IHCs, tectorial membrane, outer hair cells (OHCs) and pillar cells were mechanically removed using glass micropipettes controlled by a micromanipulator (PatchStar, Scientifica) under an upright microscope (AxioExaminer, Zeiss). For experiments in which the inner phalangeal cells (IPCs) were removed, the glass micropipette was first sealed onto the IPC, a negative pressure was then applied and the pipette was removed, leading to the mechanical disruption of the IPC. Then, the preparation was incubated with Fura-2 AM (10 μm, Thermo

Fisher Scientific) and pluronic acid (0.04%, Thermo Fisher Scientific) during 30 min and followed by a washout of 10 min. The microscope was equipped with a Filter set 21 HE (Zeiss) using the following filters/dichroic: Excitation BP: 340/30 and BP: 387/15, Beamsplitter FT: 409 and Emission BP: 510/90. Fura-2 was excited at 350/380 nm using a polychrome V (TILL-photronics). Emission fluorescence was imaged with a CDD camera (Orca-R², Hamamatsu) using a ×63 water immersion objective (NA: 1, Zeiss). 2 × 2 (pixel size of 0.215 μm) or 4 × 4 (pixel size of 0.43 μm) binning was used together with long exposure times (100 ms) at a sampling frequency of 1 Hz, and emitted light was calculated from background-corrected fluorescence. Ratio (R) corresponds to the f350/f380 emitted light and $\Delta R = R(t) - R_0$, where t is the time and R_0 corresponds to baseline.

Analysis of the Calcium Activity

Regions of interest (ROIs) of approximately 20 μm² were set at the center of IHCs, easily discernable by their shape and stereocilia. In order to remove a slow increase in the intracellular calcium baseline of the IHCs, which was sometimes observed during the time course of the experiment, and to remove the high-frequency noise components without altering the calcium transients waveforms, ratio was first filtered using a band-pass filter (Butterworth [0.005–0.1 Hz]). For each sample, the whole filtered calcium signals (residual noise plus transients) from the ROIs set in the IHCs were then averaged to obtain a grand standard deviation (SD) average that we used as a detection threshold. Therefore, calcium transients in IHCs were then detected when the ratio exceeds 1 SD. The duration of a calcium transient corresponds to the time interval between the onset and the return to baseline of the calcium transient, i.e., the time points when the calcium fluorescence intercepts one SD. In contrast to the hair cells, the inner supporting cells (ISCs) within the Kölliker's organ were not individually identified. Rather, the ISCs area was divided into several ROIs of 81 μm². This allow us to track the intracellular calcium transients in different locations of the ISC's area. Here again, the calcium signals from the ROIs set in the Kölliker's organ were filtered using a band-pass filter (Butterworth [0.005–0.1 Hz]) and then were averaged to obtain a grand SD average that we used as a detection threshold. Synchronization index (SI) between two ROIs was calculated as the ratio between the number of temporally overlapping calcium transients (Matlab logical "and" function) over the sum of overlapping plus non-overlapping calcium transients (Matlab logical "or" function). Thus, SI of 1 means that all the calcium transients in two ROIs temporally overlap, while SI of 0.5 and 0.25 mean, respectively, that half and 1/4 of the calcium transients are temporally overlapping. Then, the Euclidian distance between the centroid (the center-of-mass) of the ROIs was determined to correlate the SI against the distance between IHCs or between IHCs and ISCs.

Analysis of the calcium activity stack in 2D space (x, y) as a function of time (t) enabled to detect and track individual calcium waves within the Kölliker's organ. Images were resized to 145 × 111 pixels to have a resolution of 1 pixel/μm

independently of the initial binning set (2×2 or 4×4). Stacks were filtered using a 3D Gaussian smoothing kernel with 1 SD in order to remove the high-frequency noise. Calcium activity in one pixel was detected when the fluorescence ratio exceeds 1 SD of the whole activity of the Kölliker's organ. Calcium waves were then detected as a 3D mass of pixels. For each frame, area was calculated to estimate the maximal area. Expansion rate corresponds to the ratio between the maximal area over the time from the wave detection up to its maximum area. Because the area observed may vary between the samples, the frequency of the calcium waves within the Kölliker's organ was normalized to the observed area.

Electrophysiology

IHCs of the apical coil were patch-clamped at their basolateral face at room temperature ($22\text{--}25^\circ\text{C}$) in the perforated-patch configuration as described previously (Sendin et al., 2014). To access the plasma membrane of the IHCs, tectorial membrane, OHCs, pillar cells and IPCs were mechanically removed using glass micropipettes controlled by a micromanipulator (PatchStar, Scientifica) under an upright microscope (AxioExaminer, Zeiss). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (Kwik Fil, WPI) with a two-step vertical puller PIP 6 (HEKA Elektronik) and coated with silicone elastomer (Sylgard). Patch pipettes tips were first dipped during 2 min in intracellular solution devoid of amphotericin and backfilled afterwards with the intracellular solution containing (in mM): 135 KCl, 10 HEPES, 1 MgCl_2 and 400 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B (Calbiochem). The pH was adjusted to 7.2 with KOH and the osmolarity was between 290 and 310 mosmol/l. An EPC-10 amplifier (HEKA Elektronik) controlled by Patchmaster software (RRID:SCR_000034) was used for the action potentials measurements. All voltages were corrected for the liquid junction potential (-4.4 mV). Recordings started when the series resistance was under 30 $\text{M}\Omega$. Spontaneous action potentials were recorded in the current clamp configuration without the injection of current ($I_{\text{inj}} = 0$ pA), low-pass filtered at 5 kHz and sampled at 25 or 40 kHz. Cells whose membrane leak current exceeded -50 pA at our standard holding potential of -74 mV were discarded.

Experimental Design and Statistical Analysis

Cochlear turns from animals of either sex were analyzed. Mean calcium signal (amplitude, frequency, CV, duration, SI, maximal area and expansion rate) estimates present grand averages calculated from the mean estimates of individual cochlear turns. Mean estimates are expressed \pm SEM and were analyzed by nonparametric Wilcoxon-Mann-Whitney two-sample rank test (two-tailed). Mean estimates of individual cochlear turns are shown in scatter plots. The analysis of the calcium activity was restricted for all the samples over the first 20 min of recordings. For the tonotopic measurement, we normalized the length of the cochlea with a value of 1 to the extreme apex and a value of 0 to the hook region. Thus, apical IHCs were located at a

distance of 0.75 ± 0.02 (range, 0.69–0.83) and basal IHCs at a distance of 0.19 ± 0.02 (range, 0.11–0.28). The number of IHCs analyzed was approximately 10.7 ± 0.4 per cochlear turn. Analysis was done using Matlab (RRID:SCR_001622) and Igor Pro 7 (RRID:SCR_000325) software.

RESULTS

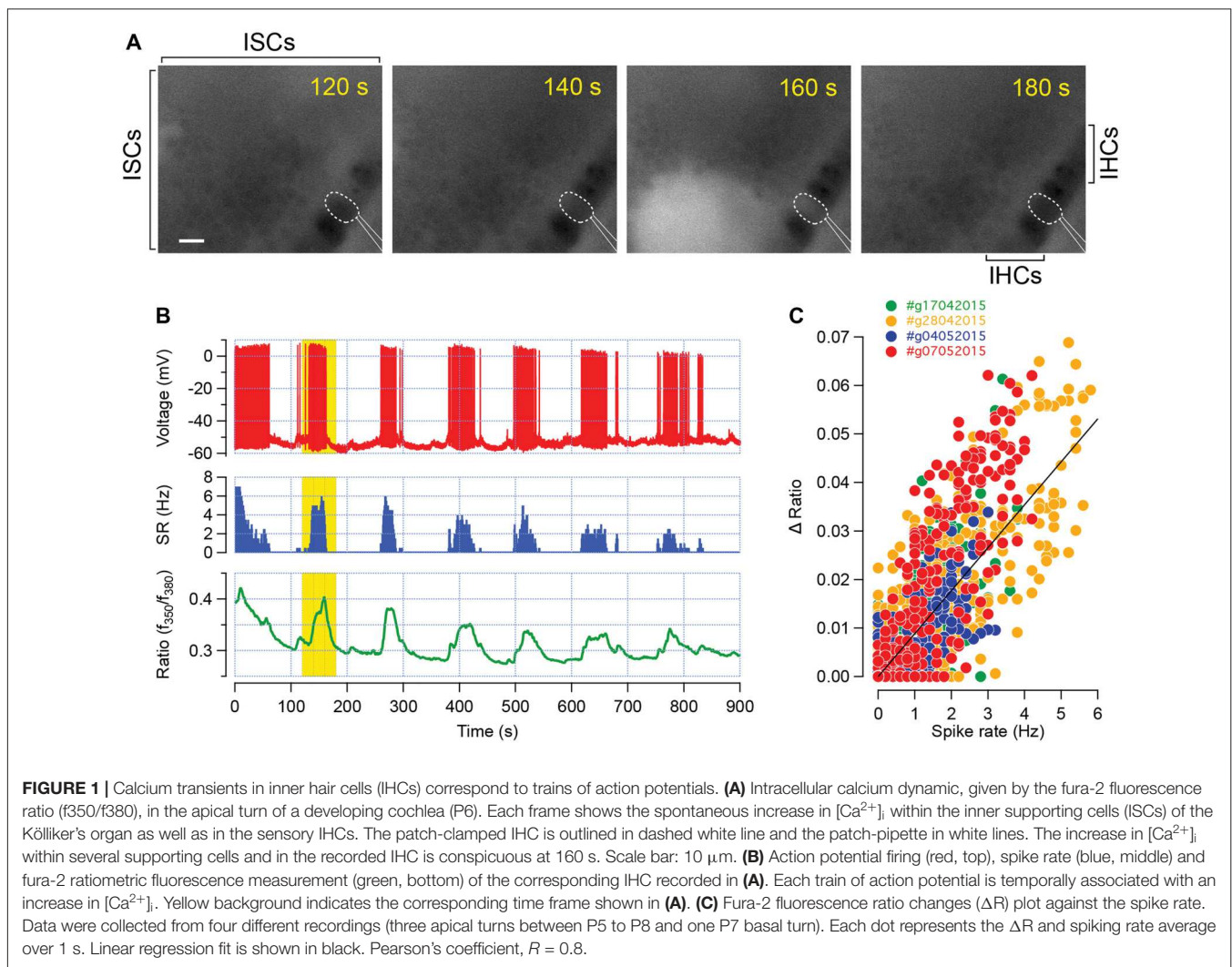
Spontaneous Intracellular Calcium Transients Correspond to Bursts of Action Potentials in IHCs

After loading the Kölliker's organ with the calcium dye Fura2-AM, spontaneous intracellular calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) rises were readily observed within the ISCs and sensory IHCs (Figure 1A). To confirm whether these calcium transients in IHCs correspond to trains of action potentials, we simultaneously probed the electrical activity of the IHCs using the perforated patch-clamp technique (Figures 1A,B). In current-clamp mode ($I_{\text{inj}} = 0$ pA), the firing of the IHCs consists in trains of action potentials flanked by silent segments as previously shown (Sendin et al., 2014). In four different IHC recordings, we found out that bursts of action potentials were associated with $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase (Figure 1B). Accordingly, plotting the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise against the spike rate demonstrated that $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases with the discharge rate (Figure 1C). Therefore, these data indicate that probing the intracellular calcium transients is a reasonable read-out of the electrical activity in developing IHCs.

Calcium Transient Patterns in IHCs Are Mostly Invariant Along the Tonotopic Axis

Next, we compared the spiking activity of the apical and basal IHCs over the first postnatal week (Figures 2A–D). Both apical and basal IHCs were characterized by spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rises of 10–20 s interspaced with silent periods (calcium transients duration of 14.6 ± 0.4 s and 14.1 ± 0.5 s for apical P1–P3 and P6–P7 IHCs, respectively; duration of 13.1 ± 0.5 s and 14.6 ± 0.9 s for basal P1–P3 and P6–P7 IHCs, respectively; Figure 2F). A slow increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ baseline was sometimes observed, reflecting most probably a reduction in the calcium extrusion capacity of the sensory cells during the time-course of the experiments (Weiler et al., 2014). Frequency and duration range of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ spikes were similar over the first postnatal-week (frequency, 0.008 ± 9.10^{-4} Hz and 0.007 ± 7.10^{-4} Hz for apical P1–P3 and P6–P7 IHCs, respectively; frequency, 0.011 ± 11.10^{-4} Hz and 0.009 ± 7.10^{-4} Hz for basal P1–P3 and P6–P7 IHCs, respectively; Figure 2E). The coefficient of variation, calculated from the inter-event interval, was also in the same range over the first post-natal week and below 1, indicating the tendency of the calcium transients to occur in a regular fashion (CV, 0.69 ± 0.02 and 0.57 ± 0.05 for apical P1–P3 and P6–P7 IHCs, respectively; CV, 0.53 ± 0.03 and 0.54 ± 0.03 for basal P1–P3 and P6–P7 IHCs, respectively; Figure 2G).

We then compared the spiking pattern between apical and basal IHCs. To do so, we plotted the frequency, duration and CV means found in the apical IHCs against those in the basal



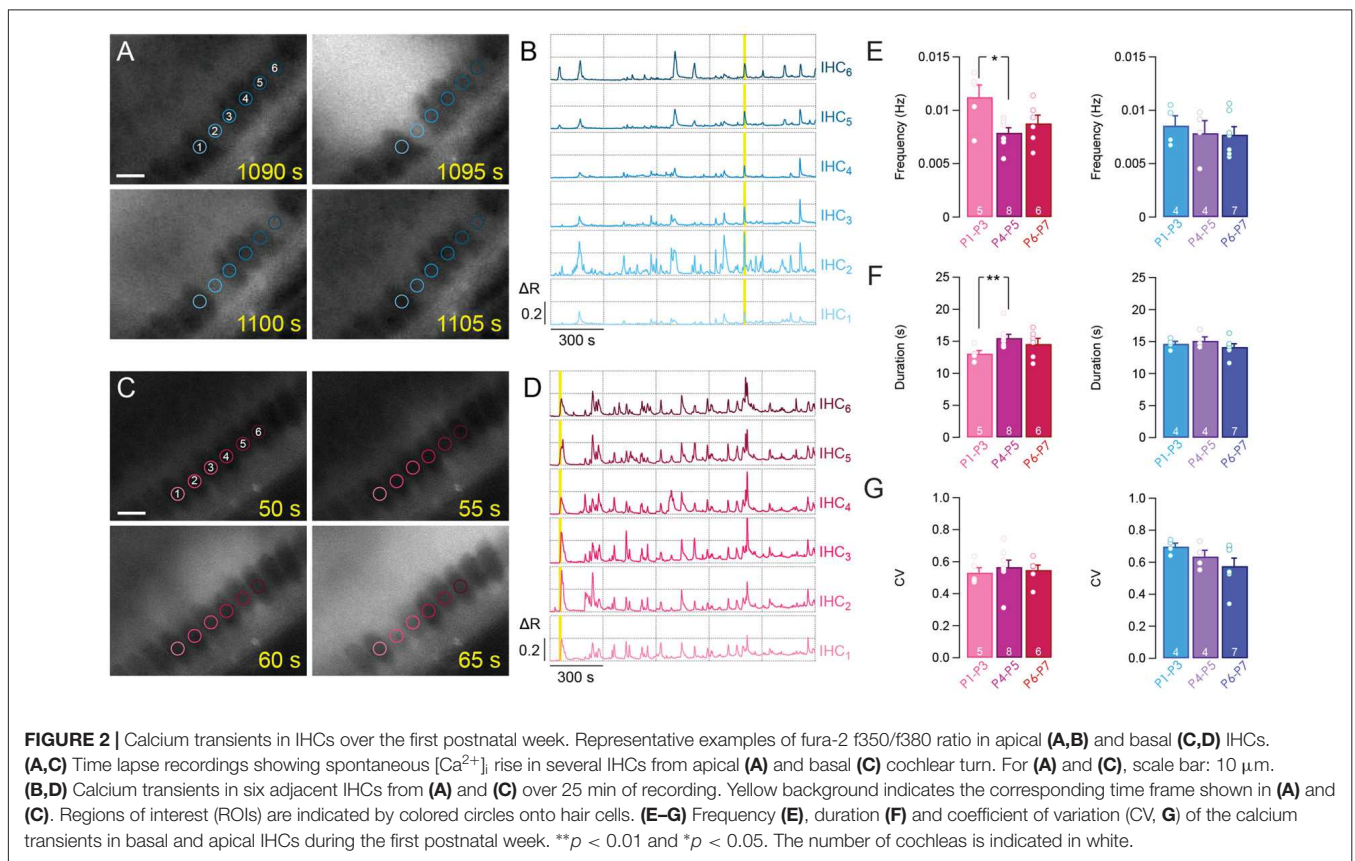
hair cells for the corresponding range of age (**Figures 3A–C**). We found-out that the frequency, duration and CV were quite similar between the apical and basal turns except for the apical IHCs at P1–P3, which showed a larger duration ($p = 0.046$, **Figure 3B**) and CV ($p = 0.008$, **Figure 3C**). Taken together, these results suggest a comparable pattern of IHC activity along the tonotopic axis of the developing cochlea.

Synchronous Activity Between Neighboring Cells

Synchronized $[Ca^{2+}]_i$ activity was observed between two adjacent IHCs throughout the first postnatal week (SI at 10 μm distance, SI_{10} , 0.48 ± 0.03 and 0.62 ± 0.06 for apical P1–P3 and P6–P7 cochleas, respectively; SI_{10} , 0.64 ± 0.05 and 0.66 ± 0.06 for basal P1–P3 and P6–P7 cochleas, respectively; **Figure 4**). Thus, IHCs, which are close to each other, can have a close temporal activity. Interestingly, we observed that pairs of IHC lying over a long distance still maintained a synchronized $[Ca^{2+}]_i$ activity at early stage of development (P1–P3) in contrast to the end of the first postnatal week (P6–P7). While most of the SI

did not significantly differ from 10–60 μm distance in P1–P3 (SI_{10} , 0.48 ± 0.03 vs. SI_{60} , 0.3 ± 0.06 , $p = 0.057$ and SI_{10} , 0.64 ± 0.05 vs. SI_{60} , 0.43 ± 0.09 , $p = 0.095$ for apical and basal turns, respectively), IHCs that are distant to each other, show a significant reduction in their SI at later developmental stages (SI_{10} , 0.62 ± 0.06 vs. SI_{60} , 0.2 ± 0.04 , $p = 0.0025$, and SI_{10} , 0.64 ± 0.05 vs. SI_{60} , 0.12 ± 0.01 , $p = 0.0021$ for P6–P7 apical and basal turns, respectively, **Figures 4A–F**).

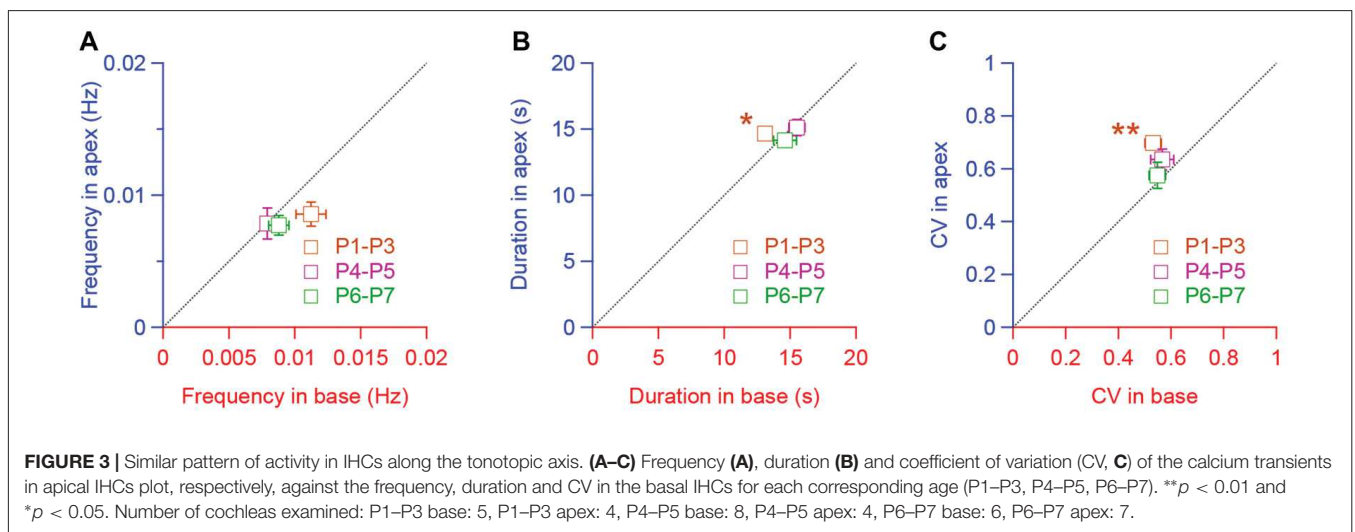
Consistent with previous studies (Tritsch et al., 2007; Tritsch and Bergles, 2010; Wang et al., 2015), the ISCs showed a robust activity, corresponding to the propagation of spontaneous calcium transients (**Figures 2A,C**). When examining the temporal pattern activity between the IHC and the ISC, we found-out that IHCs and the closest neighboring supporting cells, presumably the inner border cells, tended to be synchronized (SI_{10} , 0.64 ± 0.07 and 0.58 ± 0.07 for apical P1–P3 and P6–P7 cochleas, respectively; SI_{10} , 0.67 ± 0.04 and 0.64 ± 0.04 for basal P1–P3 and P6–P7 cochleas, respectively, **Figure 4**). Although a smaller degree of synchronized activity was observed between distant IHCs and ISCs right after birth (P1–P3), it did not reach a significant difference except for

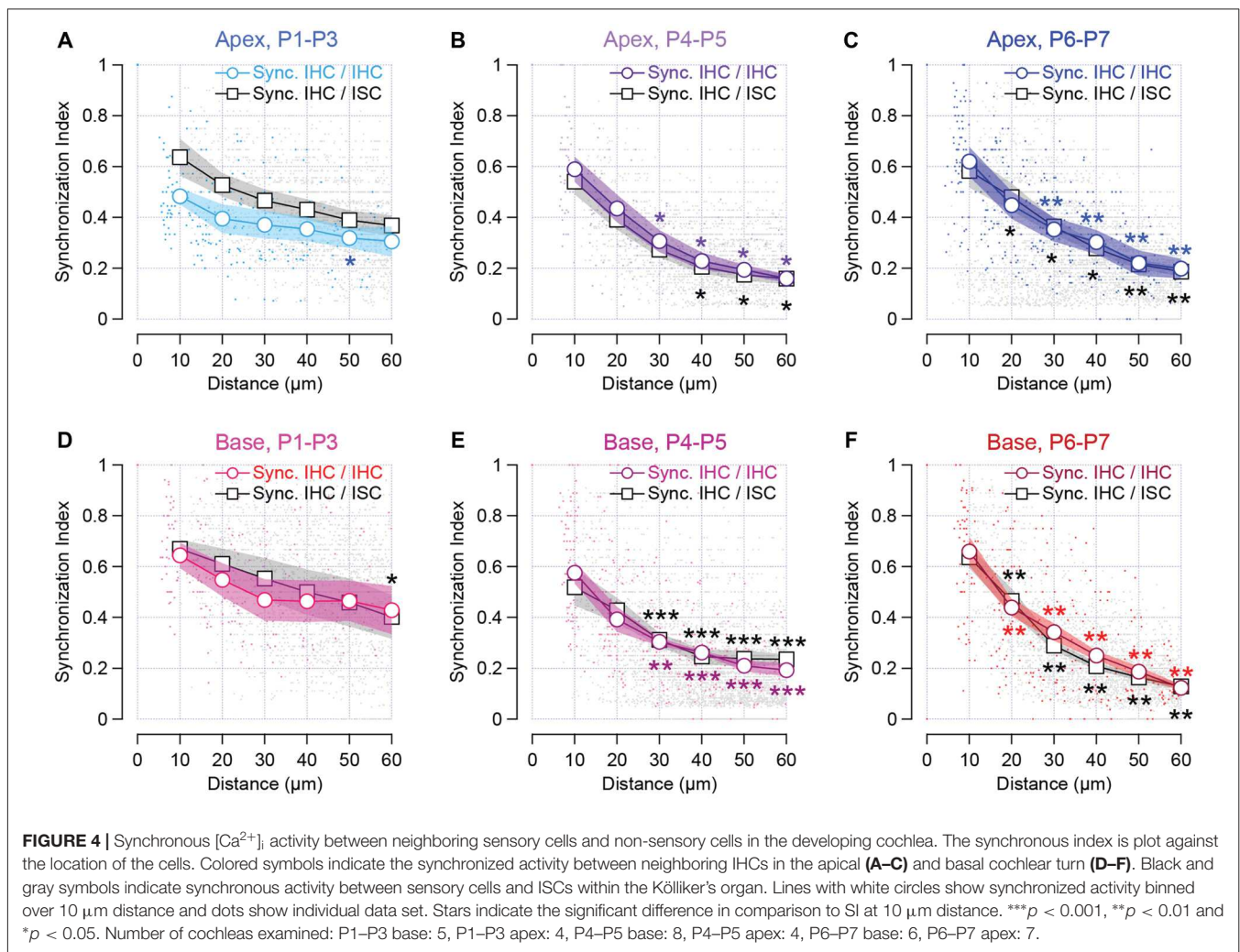


60 μ m distance at the basal turn ($p = 0.016$). In contrast, ISCs located in remote areas from the hair cells show a smaller synchronization of $[Ca^{2+}]_i$ rise with that of IHCs at the end of the first postnatal week (SI_{10} , 0.58 ± 0.07 vs. SI_{60} , 0.18 ± 0.02 , $p = 0.0023$ for apical P6–P7 cochleas, respectively, SI_{10} , 0.64 ± 0.04 , and SI_{60} , 0.13 ± 0.01 $p = 0.0021$ for basal P6–P7 cochleas, respectively, Figures 4A–F). Altogether, these data suggest that neighboring IHCs together with the closest

ISCs display a synchronized $[Ca^{2+}]_i$ activity, which tend to rapidly decrease with the distance at the end of the first postnatal week.

The reduction in the synchronous index between remote cells over the first week of development may stem from a change in the calcium waves that propagate across the supporting cells. Indeed, the size and the velocity of the calcium waves were reduced toward the end of the first





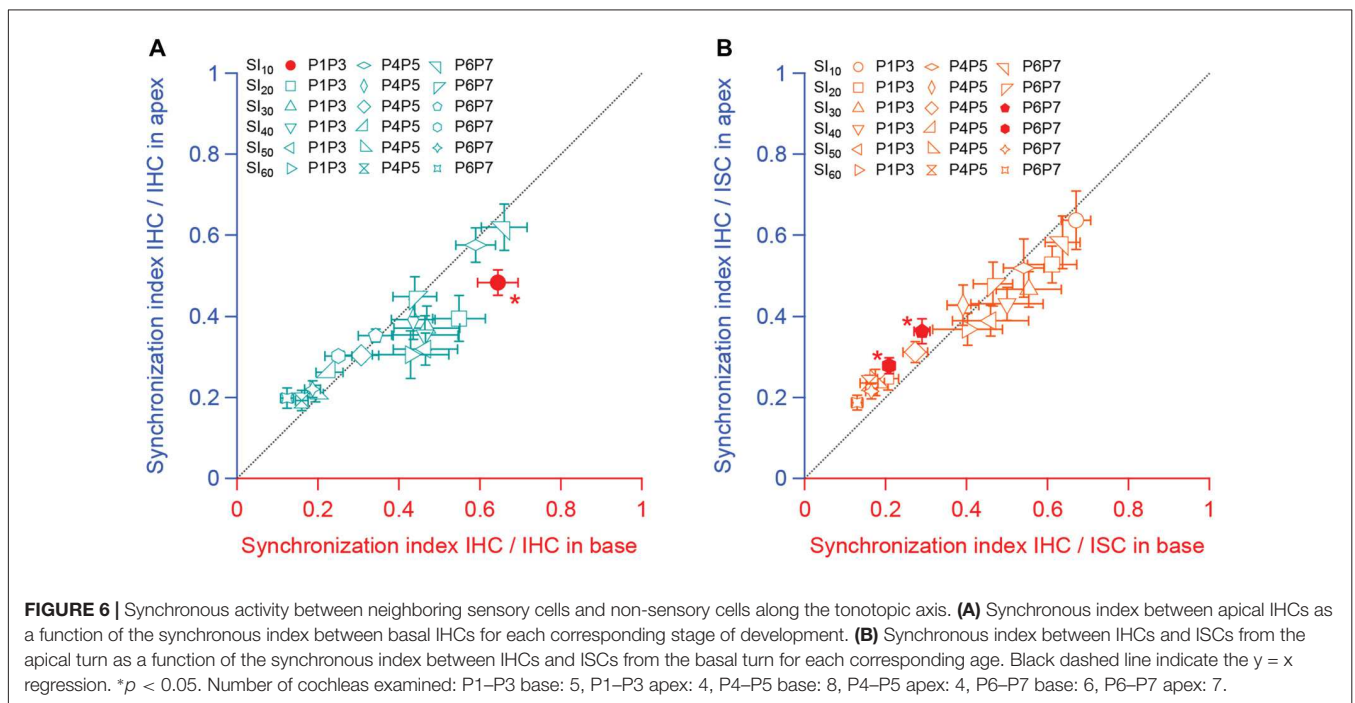
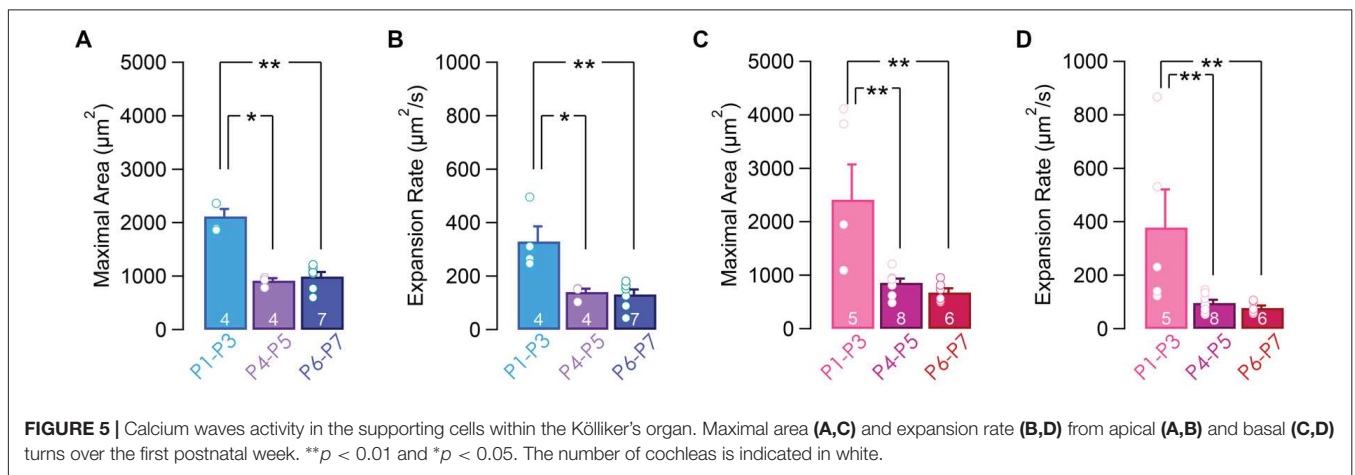
postnatal week (maximal surface area: $2118.4 \pm 140.3 \mu\text{m}^2$ at P1–P3 vs. $993.1 \pm 84 \mu\text{m}^2$ at P6–P7 in the apical turn, $p = 0.004$, **Figure 5A**, and $2415.7 \pm 656.8 \mu\text{m}^2$ at P1–P3 vs. $680.4 \pm 75.6 \mu\text{m}^2$ at P6–P7 in the basal turn, $p = 0.003$, **Figure 5C**; expansion rate: $329.7 \pm 57 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ at P1–P3 vs. $131.7 \pm 18.7 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ at P6–P7 in the apical turn, $p = 0.004$, **Figure 5B**, and $378.5 \pm 142.6 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ at P1–P3 vs. $77.6 \pm 8.9 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ at P6–P7 in the basal turn, $p = 0.003$, **Figure 5D**). Thus, the larger synchronized index between the IHCs and ISCs over long distance right after birth can be explained by larger and faster propagating calcium waves at this age.

Finally, we compared the SI between apical and basal IHCs. To do so, we plotted the SI between the sensory cells and between IHCs and ISCs found in the apical turn against those in the basal turn for the same range of age (**Figures 6A,B**). We found out that most of the SI measured at the apex did not significantly differ from those obtained in the basal turn. Taken together, these results suggest a similar mode of coordination between pairs of sensory and non-sensory cells along the base to apex gradient of the developing cochlea.

The Inner Phalangeal Cells Influence the IHCs Synchronized Activity

The radial propagation of the calcium transients makes the ISCs and notably the inner border cells, which are surrounding the IHCs at the modiolar side, essential for the excitatory input onto the hair cells (Tritsch et al., 2007; Anselmi et al., 2008; Rodriguez et al., 2012; Dayaratne et al., 2015). However, little is known about the role of the IPCs, corresponding to the supporting cells which surround the IHCs at the pillar side. We probe the consequence of the IPCs mechanical ablation on the calcium transients in IHCs and within the ISCs. The IPCs were removed using a glass micropipette akin to the patch-clamp recordings of the hair cells, in which the IPCs have to be destroyed to access the plasma membrane.

The temporal distribution of the IHCs calcium transients was not notably changed following the IPCs loss (frequency: $0.007 \pm 7.10^{-4} \text{ Hz}$ vs. $0.006 \pm 9.10^{-4} \text{ Hz}$ with and w/o IPCs, respectively; CV: 0.57 ± 0.05 vs. 0.44 ± 0.08 with and w/o IPCs, respectively, **Figures 7A,C**), except for a slight but significant



increase in the calcium transients length (duration: 14.1 ± 0.5 s vs. 18.3 ± 0.8 s with and w/o IPCs, respectively, $p = 0.002$; **Figure 7B**). Consistent with the initiation site of the calcium waves within the ISCs of the Kölliker's organ, lack of IPCs did not provoke any significant difference in the propagation of the calcium waves (frequency: 0.057 ± 0.005 Hz/ $10^4 \mu\text{m}^2$ vs. 0.057 ± 0.007 Hz/ $10^4 \mu\text{m}^2$ with and w/o IPCs, respectively; maximal surface area: $993.1 \pm 84 \mu\text{m}^2$ vs. $1045.5 \pm 148 \mu\text{m}^2$ with and w/o IPCs, respectively; expansion rate: $131.7 \pm 18.7 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ vs. $118.3 \pm 20 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ with and w/o IPCs, respectively; **Figures 7D–F**). However, a reduced synchronized $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activity between neighboring IHCs was observed following the mechanical ablation of the IPCs (SI₁₀, 0.62 ± 0.06 vs. 0.38 ± 0.06 with and w/o IPCs, respectively, $p = 0.011$; **Figure 7G**) as well as between IHCs and the closest ISCs (SI₁₀, 0.58 ± 0.07 vs. 0.34 ± 0.06 with and w/o IPCs, $p = 0.017$,

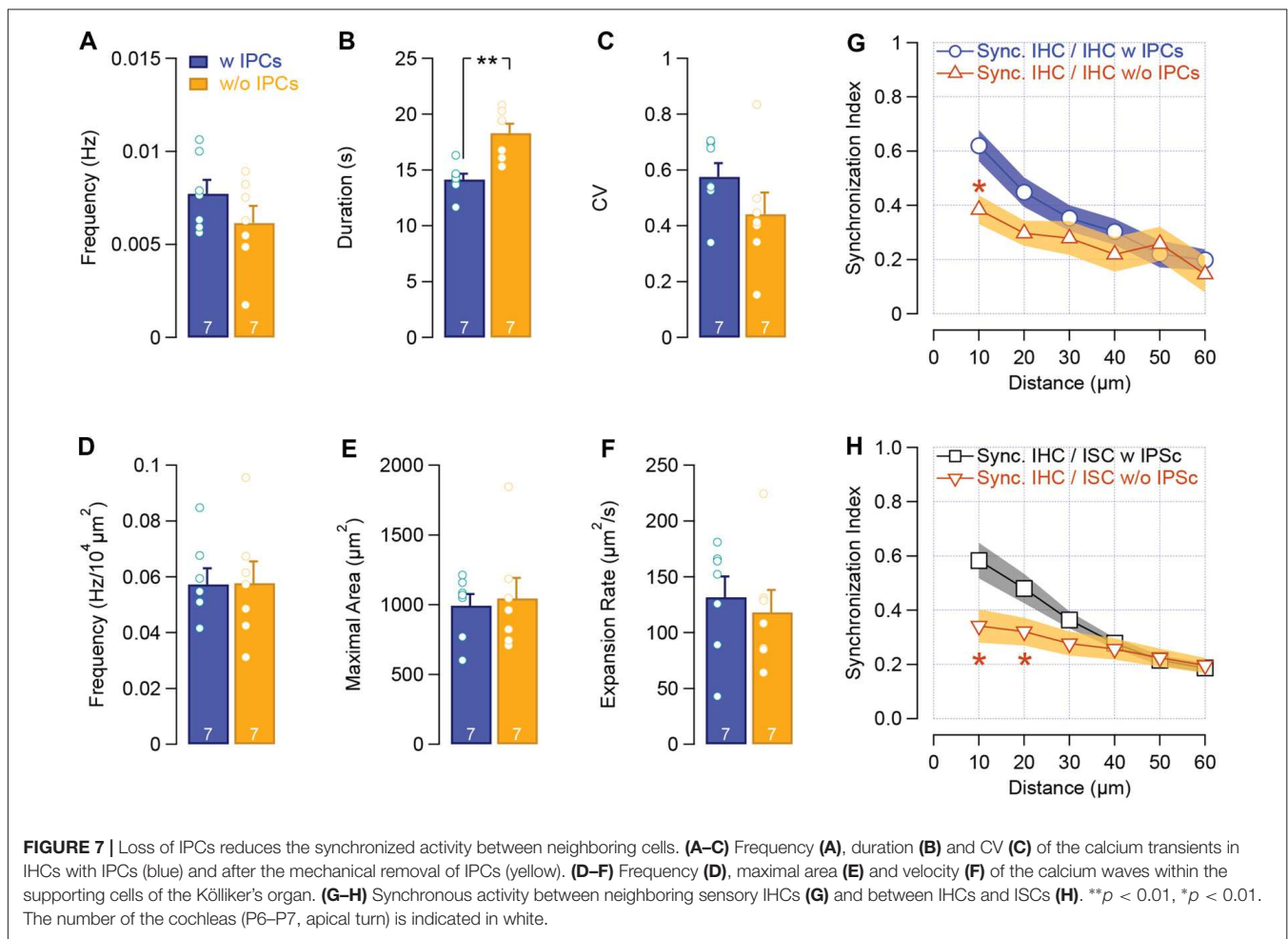
Figure 7H). These results suggest that the IPCs do not initiate the IHCs activity but help to synchronize the adjacent sensory hair cells.

DISCUSSION

In this study, we showed that calcium transients, corresponding to bursts of calcium action potentials, populate the developing IHCs activity. The intracellular calcium dynamic in IHC is mostly invariant along the base to apex gradient and neighboring IHCs show a synchronized $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activity.

Calcium Transients in IHCs as a Proxy of Action Potential Bursts

During the two first postnatal weeks, IHCs fire trains of calcium action potentials with silent segments (Sendin et al., 2014;



Nouvian et al., 2015). In this study, IHCs exhibit spontaneous calcium peaks, interspaced with blank periods, consistent with the firing of action potential bursts. Accordingly, the frequency and temporal distribution of these calcium spikes are, to some extent, in a similar range of those recorded in perforated patch-clamp (Sendin et al., 2014). However, the duration of the calcium transients (around 15 s) was shorter than the length of action potentials bursts measured in patch-clamp (which approximates around 50 s at the end of the first postnatal week; Sendin et al., 2014). Developing IHCs are innervated by cholinergic efferent fibers, which release acetylcholine to open the IHC calcium permeable $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic receptor (Glowatzki and Fuchs, 2000; Katz et al., 2004; Roux et al., 2011). Thus, the calcium transients reflecting the calcium action potentials could have been confounded by the calcium influx through the $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic receptor. This hypothesis is, however, unlikely as the calcium transients in the IHCs nicely correlate with the discharge rate of action potential. To achieve tight-seal patch-clamp recordings, the IPCs, which are the supporting cells facing the pillar side, are mechanically removed. In contrast, IPCs are left intact in our calcium imaging experiments. Therefore, the IPCs may influence the duration of the calcium transients in IHCs. Because the action potential firing in IHCs has been

shown to be driven by KCl secretion from the supporting cells (Wang et al., 2015), the IPCs may be involved in the reuptake of KCl, akin the Deiters cells, which act as siphons to recycle the efflux of potassium from the OHCs (Boettger et al., 2002). Accordingly, the supporting cells of the IHCs express KCC4, required to remove potassium from the extracellular spaces (Boettger et al., 2002). Thus, the absence of IPCs may lead to a longer exposure of the IHCs to KCl. On the other hand, removing the surrounding cells would increase the KCl diffusion away from the sensory cells. In our experiments, the disruption of the IPCs tends to slightly increase the duration of the calcium transients in IHCs. However, the $[Ca^{2+}]_i$ rise length still remains far below the action potential bursts duration. Thus, patch-clamp recordings may affect the behavior of the IHCs. During the perforation period, in which the IHCs are held at hyperpolarized potential (-74 mV) before switching to current-clamp, the calcium channels could recover from inactivation and then be capable to sustain longer bursts of action potentials (Sendin et al., 2014).

Invariant Pattern of Activity

Spontaneous activity in the sensory organs has been proposed to consolidate the synapses along the ascending sensory pathway

(Meister et al., 1991; Wong and Oakley, 1996). In the auditory modality, the pattern of the auditory nerve fibers firing helps to refine the tonotopic map of the higher centers (Clause et al., 2014). Because the IHCs drive the spontaneous activity in the auditory nerve (Wong et al., 2013), the sensory hair cell activity should therefore be a key determinant in this maturation process. Two major mechanisms could account for the tonotopic axis specification in the auditory nuclei. In a first scenario, IHCs from basal and apical location have different pattern of activity, sustained and bursting-like spiking, respectively (Johnson et al., 2011). In this framework, auditory centers receiving a continuous input will be differentiated for high-frequencies sound encoding while others receiving patterned inputs will be specialized for low-frequencies sound encoding. In an alternative scenario, the IHC activity is rather similar along the base to apex cochlear gradient and tonotopic axis would be instructed by the coincident activation of adjacent IHCs (Tritsch and Bergles, 2010; Sendin et al., 2014). In our study, IHCs show a comparable behavior across the base to apex cochlear axis together with a large synchronous activity between neighboring IHCs. This result is therefore consistent with previous studies showing that neighboring IHCs show a similar pattern of inward currents, which have been attributed to purinergic receptor activation (Tritsch et al., 2007; Tritsch and Bergles, 2010). However, we observed that the SI between the IHCs decreases more rapidly with the distance than it has been reported earlier (Tritsch and Bergles, 2010). This difference could be explained by the threshold criteria presently used in our study, excluding weak calcium transients that may correspond to small currents in amplitude.

In our study, experiments were carried-out at room temperature to prevent any physiological-temperature degradation of the cochlear explant that may preclude the recordings of the IHC's activity over a long period of time. Although the room-temperature condition may change the frequency and duration of the calcium transients (Sendin et al., 2014), it is unlikely that it would completely reverse the genuine behavior of the IHCs, i.e., from sustained to bursting activity. Indeed, patch-clamp recordings at room and physiological temperature indicated a similar bursting activity of the hair cells irrespective of their location along the tonotopic axis (Sendin et al., 2014).

Synchronized Activity in the Kölliker's Organ

ATP has been proposed to be a major key factor to release calcium from the internal stores in the neighboring supporting cells in order to regulate the IHCs excitability (Tritsch et al., 2007; Anselmi et al., 2008; Rodriguez et al., 2012; Wang et al., 2015). In addition, the activity in immature IHCs has been proposed to arise from an efflux of KCl from the neighboring supporting cells into the extracellular spaces, which surround the sensory hair cells (Wang et al., 2015). As a result, the ISCs activation triggers the depolarization of the closest IHCs to fire action potentials (Tritsch et al., 2007;

Wang et al., 2015). Consistently, the IHCs and the closest ISCs facing the modiolar side (the inner border cells) show a high degree of synchronized activity. Interestingly, the coordinated activity between distant sensory and non-sensory cells varies during the first postnatal week, most likely because of the decrease in the area and velocity of the propagating calcium waves. This finding is somehow different from a previous study showing that the calcium waves area increases up to 6 days after birth (Tritsch and Bergles, 2010). Although this difference may arise from the two different species used (mouse vs. rat), further experiments are required to resolve this discrepancy.

In our experiments, the lack of IPCs does not alter the frequency of the IHCs calcium transients, excluding a crucial function of the IPCs in initiating the hair cells spiking activity. By contrast, the synchronized activity between IHCs was quite sensitive to the mechanical loss of the IPCs. It has been demonstrated that the calcium propagation within the supporting cells of the Kölliker's organ relies on the diffusion of second messengers, such as IP₃, through the connexins network expressed by the ISCs (Beltramello et al., 2005; Anselmi et al., 2008; Rodriguez et al., 2012). By diffusing the second messengers and releasing KCl in the vicinity of the hair cells, the IPCs may help to synchronize adjacent IHCs. In addition, the coordinated activity between IHCs and neighboring ISCs is reduced after the loss of the IPCs. Because of the coupling between the IPCs and the inner border cells through gap-junctions (Jagger and Forge, 2006), the mechanical destruction of the IPCs may alter the inner border cells and result in a reduced activation of the sensory cells. In this hypothesis, the frequency of the calcium transients in the IHCs should be affected, in contrast to our result. Thus, the loss of the overlapping activity between the IHCs and the closest ISCs suggests that the IPCs organize the temporal distribution of the sensory cells' activity, most likely through the transfer of the calcium signaling.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A-GH and J-CC equally contributed to the article. A-GH, GS, JB, J-LP and RN designed the research. A-GH, GS and RN performed the research. J-CC, JB, J-LP and RN contributed to unpublished reagents and analytic tools. A-GH, J-CC and RN analyzed data. A-GH, J-CC, GS, JB, J-LP and RN wrote the article.

FUNDING

This work was supported by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-13-JSV1-0009-01 to RN and ANR-15-CE16-0016-01 to Michèle Studer and J-LP). GS is a recipient of the postdoctoral fellowship of University of Montpellier.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the lab members for valuable discussions.

REFERENCES

- Anniko, M., Wroblewski, R., and Wersäll, J. (1979). Development of endolymph during maturation of the mammalian inner ear. A preliminary report. *Arch Otorhinolaryngol.* 225, 161–163. doi: 10.1007/bf00455250
- Anselmi, F., Hernandez, V. H., Crispino, G., Seydel, A., Ortolano, S., Roper, S. D., et al. (2008). ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca^{2+} signals across the inner ear. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105, 18770–18775. doi: 10.1073/pnas.0800793105
- Beltramello, M., Piazza, V., Bukauskas, F. F., Pozzan, T., and Mammano, F. (2005). Impaired permeability to $Ins(1,4,5)P_3$ in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness. *Nat. Cell Biol.* 7, 63–69. doi: 10.1038/ncb1205
- Beutner, D., and Moser, T. (2001). The presynaptic function of mouse cochlear inner hair cells during development of hearing. *J. Neurosci.* 21, 4593–4599. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-13-04593.2001
- Boettger, T., Hübner, C. A., Maier, H., Rust, M. B., Beck, F. X., and Jentsch, T. J. (2002). Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter *Kcc4*. *Nature* 416, 874–878. doi: 10.1038/416874a
- Clause, A., Kim, G., Sonntag, M., Weisz, C. J. C., Vetter, D. E., Rübnsamen, R., et al. (2014). The precise temporal pattern of prehearing spontaneous activity is necessary for tonotopic map refinement. *Neuron* 82, 822–835. doi: 10.1016/j.neuron.2014.04.001
- Clause, A., Lauer, A. M., and Kandler, K. (2017). Mice lacking the $\alpha 9$ subunit of the nicotinic acetylcholine receptor exhibit deficits in frequency difference limens and sound localization. *Front. Cell. Neurosci.* 11:167. doi: 10.3389/fncel.2017.00167
- Dayaratne, M. W. N., Vljakovic, S. M., Lipski, J., and Thorne, P. R. (2015). Putative role of border cells in generating spontaneous morphological activity within Kölliker's organ. *Hear. Res.* 330, 90–97. doi: 10.1016/j.heares.2015.06.017
- Ehret, G. (1985). Behavioural studies on auditory development in mammals in relation to higher nervous system functioning. *Acta Otolaryngol.* 99, 31–40. doi: 10.3109/00016488509121754
- Glowatzki, E., and Fuchs, P. A. (2000). Cholinergic synaptic inhibition of inner hair cells in the neonatal mammalian cochlea. *Science* 288, 2366–2368. doi: 10.1126/science.288.5475.2366
- Jagger, D. J., and Forge, A. (2006). Compartmentalized and signal-selective gap junctional coupling in the hearing cochlea. *J. Neurosci.* 26, 1260–1268. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4278-05.2006
- Johnson, S. L., Eckrich, T., Kuhn, S., Zampini, V., Franz, C., Ranatunga, K. M., et al. (2011). Position-dependent patterning of spontaneous action potentials in immature cochlear inner hair cells. *Nat. Neurosci.* 14, 711–717. doi: 10.1038/nn.2803
- Johnson, S. L., Kuhn, S., Franz, C., Ingham, N., Furness, D. N., Knipper, M., et al. (2013). Presynaptic maturation in auditory hair cells requires a critical period of sensory-independent spiking activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 110, 8720–8725. doi: 10.1073/pnas.1219578110
- Katz, E., Elgoyhen, A. B., Gómez-Casati, M. E., Knipper, M., Vetter, D. E., Fuchs, P. A., et al. (2004). Developmental regulation of nicotinic synapses on cochlear inner hair cells. *J. Neurosci.* 24, 7814–7820. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2102-04.2004
- Kros, C. J., Ruppersberg, J. P., and Rüsch, A. (1998). Expression of a potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice. *Nature* 394, 281–284. doi: 10.1038/28401
- Marcotti, W. (2012). Functional assembly of mammalian cochlear hair cells. *Exp. Physiol.* 97, 438–451. doi: 10.1113/expphysiol.2011.059303
- Marcotti, W., Johnson, S. L., Holley, M. C., and Kros, C. J. (2003). Developmental changes in the expression of potassium currents of embryonic, neonatal and mature mouse inner hair cells. *J. Physiol.* 548, 383–400. doi: 10.1111/j.1469-7793.2003.00383.x
- Meister, M., Wong, R. O., Baylor, D. A., and Shatz, C. J. (1991). Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science* 252, 939–943. doi: 10.1126/science.2035024
- Mikaëlian, D., Alford, B. R., and Ruben, R. J. (1965). Cochlear potentials and 8 nerve action potentials in normal and genetically deaf mice. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 74, 146–157. doi: 10.1177/000348946507400113
- 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. doi: 10.1007/s00232-005-0854-4
- Nouvian, R., Eybalin, M., and Puel, J.-L. (2015). Cochlear efferents in developing adult and pathological conditions. *Cell Tissue Res.* 361, 301–309. doi: 10.1007/s00441-015-2158-z
- Rodríguez, L., Simeonato, E., Scimemi, P., Anselmi, F., Cali, B., Crispino, G., et al. (2012). Reduced phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis impairs inner ear Ca^{2+} signaling and high-frequency hearing acquisition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109, 14013–14018. doi: 10.1073/pnas.1211869109
- Roux, I., Wersinger, E., McIntosh, J. M., Fuchs, P. A., and Glowatzki, E. (2011). Onset of cholinergic efferent synaptic function in sensory hair cells of the rat cochlea. *J. Neurosci.* 31, 15092–15101. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2743-11.2011
- Saunders, J. C., Doan, D. E., and Cohen, Y. E. (1993). The contribution of middle-ear sound conduction to auditory development. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* 106, 7–13. doi: 10.1016/0300-9629(93)90030-8
- Sendin, G., Bourien, J., Rassendren, F., Puel, J.-L., and Nouvian, R. (2014). Spatiotemporal pattern of action potential firing in developing inner hair cells of the mouse cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 111, 1999–2004. doi: 10.1073/pnas.1319615111
- Shrestha, B. R., Chia, C., Wu, L., Kujawa, S. G., Liberman, M. C., and Goodrich, L. V. (2018). Sensory neuron diversity in the inner ear is shaped by activity. *Cell* 174, 1229.e17–1246.e17. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.007
- Sun, S., Babola, T., Pregernig, G., So, K. S., Nguyen, M., Su, S.-S. M., et al. (2018). Hair cell mechanotransduction regulates spontaneous activity and spiral ganglion subtype specification in the auditory system. *Cell* 174, 1247.e15–1263.e15. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.008
- Tritsch, N. X., and Bergles, D. E. (2010). Developmental regulation of spontaneous activity in the Mammalian cochlea. *J. Neurosci.* 30, 1539–1550. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3875-09.2010
- Tritsch, N. X., Rodríguez-Contreras, A., Crins, T. T. H., Wang, H. C., Borst, J. G. G., and Bergles, D. E. (2010). Calcium action potentials in hair cells pattern auditory neuron activity before hearing onset. *Nat. Neurosci.* 13, 1050–1052. doi: 10.1038/nn.2604
- Tritsch, N. X., Yi, E., Gale, J. E., Glowatzki, E., and Bergles, D. E. (2007). The origin of spontaneous activity in the developing auditory system. *Nature* 450, 50–55. doi: 10.1038/nature06233
- Wang, H. C., Lin, C.-C., Cheung, R., Zhang-Hooks, Y., Agarwal, A., Ellis-Davies, G., et al. (2015). Spontaneous activity of cochlear hair cells triggered by fluid secretion mechanism in adjacent support cells. *Cell* 163, 1348–1359. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.070
- Weiler, S., Krinner, S., Wong, A. B., Moser, T., and Pangrsič, T. (2014). ATP hydrolysis is critically required for function of $Cav1.3$ channels in cochlear inner hair cells via fueling Ca^{2+} clearance. *J. Neurosci.* 34, 6843–6848. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4990-13.2014
- Wong, A. B., Jing, Z., Rutherford, M. A., Frank, T., Strenzke, N., and Moser, T. (2013). Concurrent maturation of inner hair cell synaptic Ca^{2+} influx and auditory nerve spontaneous activity around hearing onset in mice. *J. Neurosci.* 33, 10661–10666. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1215-13.2013
- Wong, R. O., and Oakley, D. M. (1996). Changing patterns of spontaneous bursting activity of on and off retinal ganglion cells during development. *Neuron* 16, 1087–1095. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80135-x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Harrus, Ceccato, Sendin, Bourien, Puel and Nouvian. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.