

Université de Liège

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

**Développement morphologique de
l'organe de Corti du rat entre les 16 et
19^{ème} jours embryonnaires**

Mémoire présenté par

Nicolas Thelen

*En vue de l'obtention du grade de
licencié en Sciences Biologiques*

Année académique 2004-2005

Université de Liège

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

**Développement morphologique de
l'organe de Corti du rat entre les 16 et
19^{ème} jours embryonnaires**

Mémoire présenté par

Nicolas Thelen

*En vue de l'obtention du grade de
licencié en Sciences Biologiques*

Année académique 2004-2005

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

La réalisation de ce Mémoire aurait cependant été impossible sans le Docteur Brigitte Malgrange et Mademoiselle Francine Skivée. Ceux-ci nous ont dispensé sans compter leur temps précieux, leurs idées, leurs connaissances et une aide technique primordiale. Leur enthousiasme nous a également accompagné tout au long de ce travail. Qu'ils en soient remerciés.

Nos plus vifs remerciements vont également à François Lallemand et à Madame Patricia Ernst pour leur patience et leurs conseils lors des dissections.

Merci à toutes les personnes qui nous ont soutenu et encouragé tout au long de nos études..

Enfin, nous remercions tous ceux qui directement ou indirectement ont contribué à la réalisation de ce Mémoire.

1.INTRODUCTION GENERALE.....	1
1.1. INTRODUCTION.....	2
1.2. STRUCTURE DU CANAL COCHLÉAIRE.....	2
1.3. STRUCTURE DE L'ORGANE DE CORTI.....	5
1.3.1. <i>Cellules piliers et espaces intercellulaires</i>	5
1.3.2. <i>Cellules de soutien</i>	6
1.3.3. <i>Cellules sensorielles</i>	6
1.3.4. <i>Cellules et structures adjacentes à l'organe de Corti</i>	8
1.3.5. <i>Innervation de l'organe de Corti</i>	9
1.4. DÉVELOPPEMENT MORPHOLOGIQUE DE L'ORGANE DE CORTI.....	10
1.4.1. <i>Développement du canal cochléaire</i>	10
1.4.2. <i>Développement de l'organe de Corti</i>	11
1.4.3. <i>Précurseurs des cellules sensorielles</i>	12
1.4.4. <i>Développement de l'innervation de l'organe de Corti</i>	12
1.5. OBJECTIFS.....	14
2.MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	15
2.1.1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE.....	16
2.1.2. <i>Prélèvement de l'organe de Corti</i>	16
2.1.3. <i>Mise en culture de l'organe de Corti</i>	16
2.2.1. PRÉPARATION DES ORGANES DE CORTI POUR L'OBSERVATION AU MICROSCOPE PHOTONIQUE.....	16
2.2.2. OBSERVATION AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION.....	17
3. RÉSULTATS.....	18
3.1. DÉVELOPPEMENT DE L'ORGANE DE CORTI IN VIVO.....	19
3.1.1. <i>Embryons de rat à 16 jours</i>	19
3.1.1.1. Régions basale et médiane.....	19
3.1.1.2. Région apicale.....	19
3.1.2. <i>Embryons de rat à 17 jours</i>	23
3.1.2.1. Région basale.....	23
3.1.2.2. Région médiane.....	23
3.1.2.3. Région apicale.....	27
3.1.3. <i>Embryons de rat à 18 jours</i>	27
3.1.3.1. Région basale.....	27
3.1.3.2. Région médiane.....	30
3.1.3.3. Région apicale.....	30
3.1.4. <i>Embryons de rat à 19 jours</i>	33
3.1.4.1. Région basale.....	33
3.1.4.2. région médiane.....	33
3.1.4.3. Région apicale.....	33
3.2. DÉVELOPPEMENT DE L'ORGANE DE CORTI IN VITRO.....	36
4.DISCUSSION GÉNÉRALE.....	40
4.1. DÉVELOPPEMENT DE L'ORGANE DE CORTI IN VIVO.....	41
4.2. DÉVELOPPEMENT DE L'ORGANE DE CORTI IN VITRO.....	42
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	44
6. BIBLIOGRAPHIE.....	46

Liste des abréviations et des symboles

°C : degré centigrade

μm : micromètre

Å : angström

b* : cellule bordante

CO₂ : dioxyde de carbone

d* : cellule de Deiter

DMEM : Dubbelco's Modified Eagle Medium

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

GER : 'greater epithelial ridge', grande crête épithéliale

h* : cellule de Hensen

i* : cellule sensorielle interne

IHC : 'inner hair cell', cellule sensorielle interne

LER : 'lesser epithelial ridge', petite crête épithéliale

mM, M : milli-, molaire

o* : cellule sensorielle externe

OHC : 'outer hair cell', cellule sensorielle externe

p* : cellule pilier

PBS : 'phosphate buffer saline', tampon phosphate salin

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

RER : réticulum endoplasmique rugueux

s* : cellule de soutien interne

t* : cellule tectale

u* : cellule sous-tectale

v* : vaisseau spiral

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

1.INTRODUCTION GENERALE

1.1. Introduction

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

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

1.2. Structure du canal cochléaire

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

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

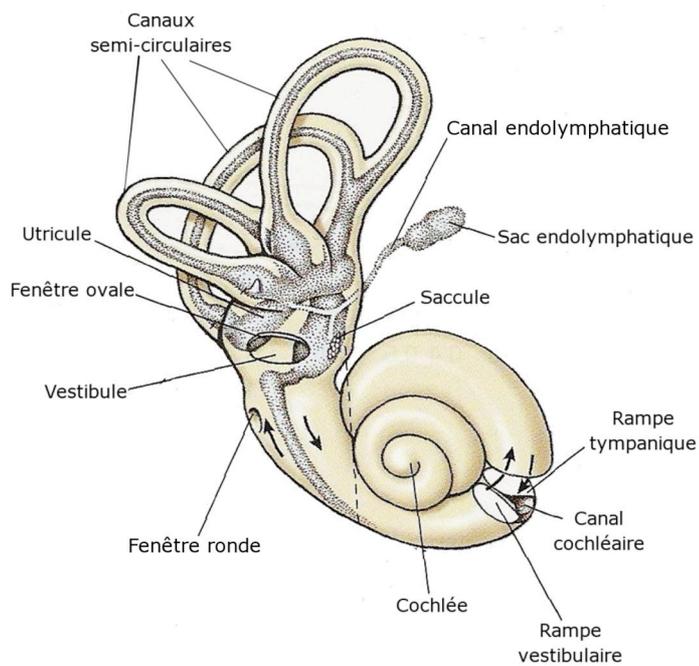


Figure 1. Représentation schématique de l'oreille interne des mammifères. Repris de Randall D., Burggren W., French K. 1997. *Eckert Animal Physiology, mechanisms and adaptations*. 4th ed. W.H. Freeman and Compagny. New York.

1. INTRODUCTION GENERALE

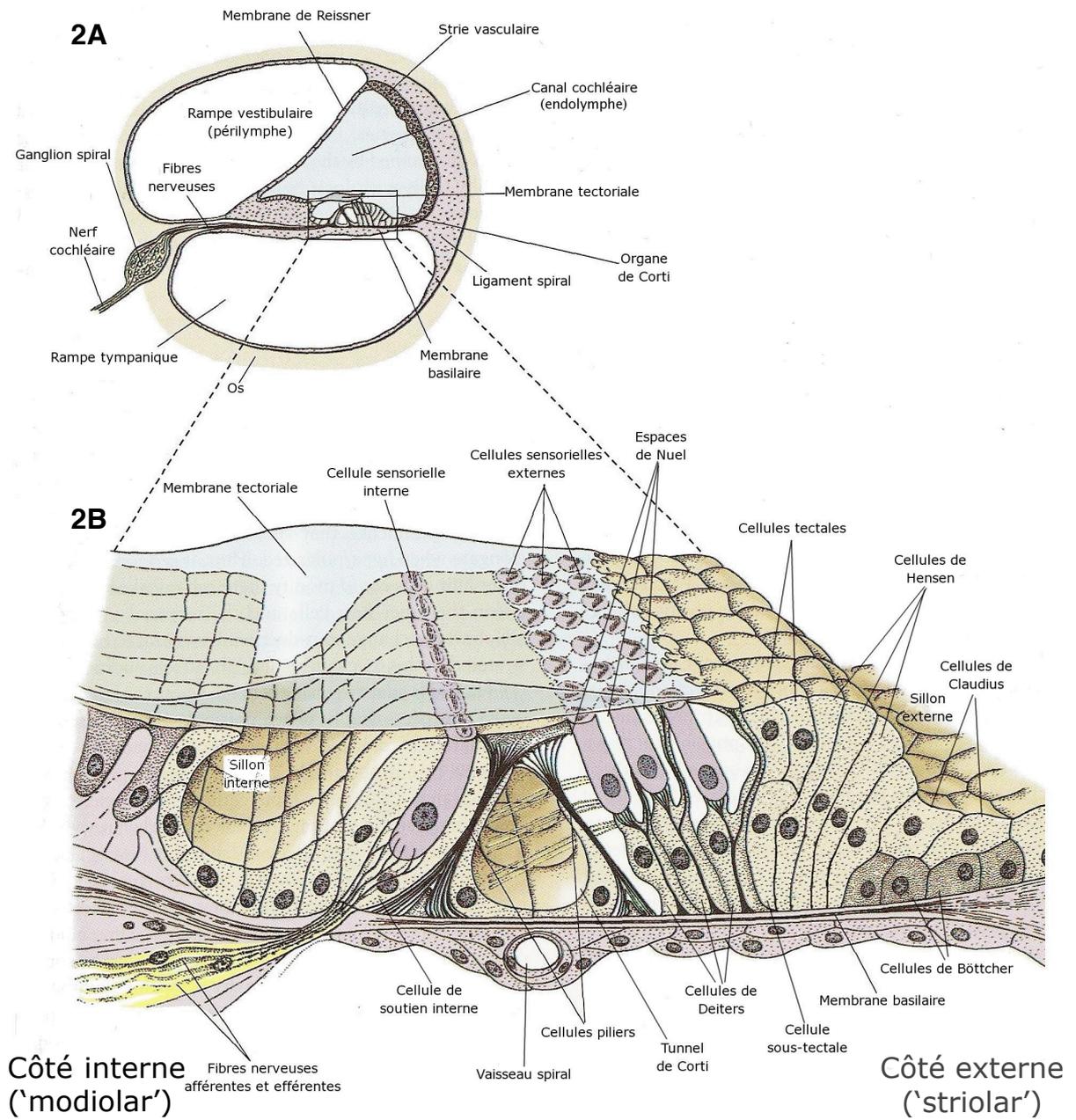


Figure 2. Représentation schématique en A du canal cochléaire et en B de l'organe de Corti. Repris et modifié de Randall D., Burggren W., French K. 1997. *Eckert Animal Physiology, mechanisms and adaptations*. 4th ed. W.H. Freeman and Compagny. New York.

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

1.3. Structure de l'organe de Corti

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

1.3.1. Cellules piliers et espaces intercellulaires

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

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

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

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

1.3.2. Cellules de soutien

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

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

1.3.3. Cellules sensorielles

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

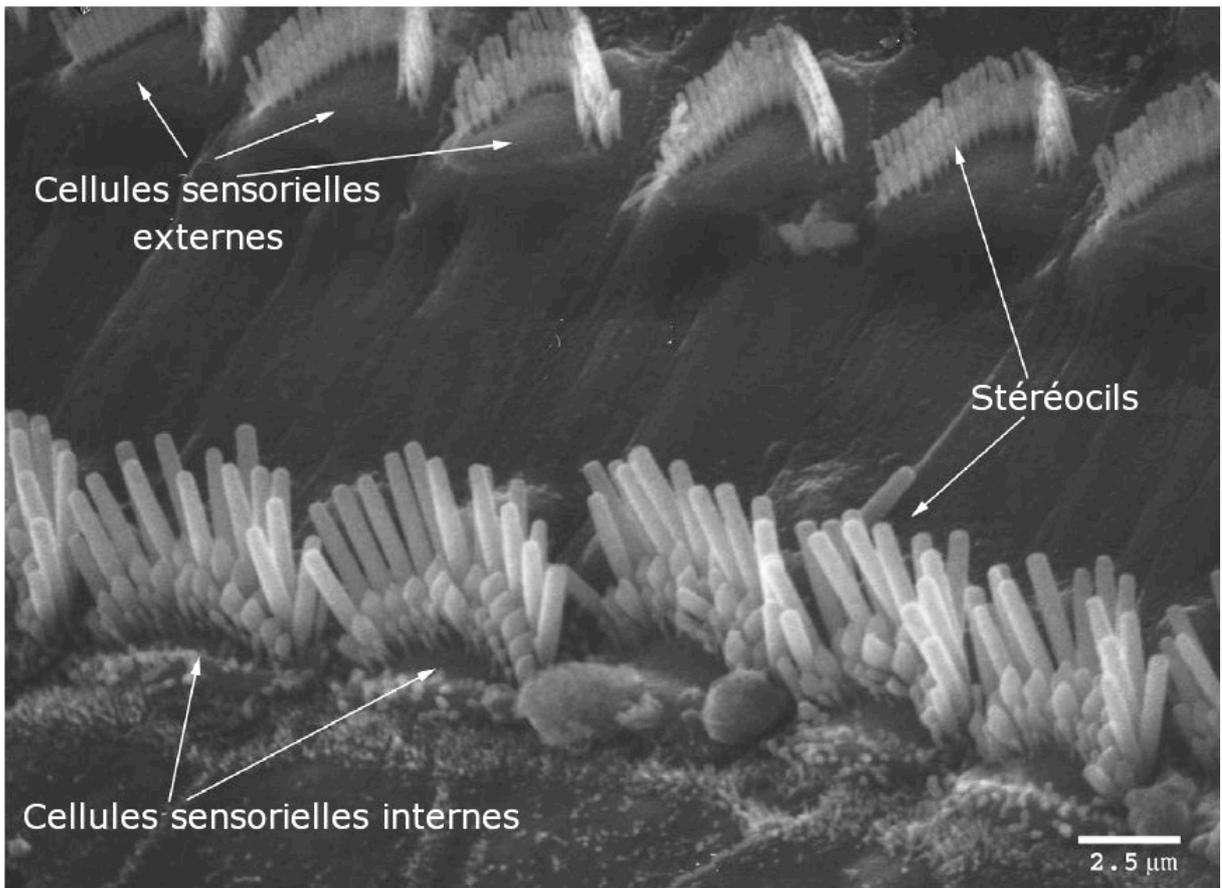


Figure 3. Face apicale des cellules sensorielles internes et externes vues en microscopie électronique à balayage. Repris de Raphael Y. and Altschuler R.A., 2003.

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

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

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

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

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

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

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

On trouve ensuite des cellules de forme cubique, les cellules de Böttcher, recouvertes et séparées de la lumière du canal cochléaire par les cellules de Claudius également de forme cubique et au cytoplasme moins riche en organites que les cellules de Böttcher (Junqueira et al., 1977).

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

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

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

La membrane tectoriale est une structure fibreuse, gélatineuse et acellulaire (Junqueira et al., 1977) Sa partie externe repose sur le pôle apical des cellules de l'organe de Corti, mais il semble que seuls les stéréocils les plus longs des OHC lui soient liés. La membrane tectoriale est perforée de fins canalicules qui serviraient à la circulation de l'endolymphe.

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

1.3.5. Innervation de l'organe de Corti

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

1.4. Développement morphologique de l'organe de Corti

1.4.1. Développement du canal cochléaire

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

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

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

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

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

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

1.4.2. Développement de l'organe de Corti

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

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

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

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

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

chat (Sato et al., 1999) et à P4 chez la gerbille (Ito et al., 1995). L'ouverture des espaces de Nuel débute durant la même période. Chez la plupart des mammifères, l'organe de Corti ne serait vraiment mature que 10 à 14 jours après le début de la fonction auditive (Pujol and Hilding, 1973).

1.4.3. Précurseurs des cellules sensorielles

Un modèle in vitro d'apparition de cellules sensorielles surnuméraires chez le rat a permis d'avancer l'hypothèse que les cellules tectales pourraient être le type cellulaire précurseur des OHC (Malgrange et al., 2002). En effet, à E19, des similitudes morphologiques ont été relevées entre OHC et cellules tectales comme la perte de contact avec la membrane basale et la forme du réticulum endoplasmique rugueux (RER). On peut également faire un lien entre la présence d'une accumulation de matériel fibrillaire au niveau apical des cellules tectales et la plaque cuticulaire des cellules sensorielles. Egalement observées, les similitudes que partagent les cellules de Hensen avec les cellules tectales, les cellules sous-pectales et les cellules de Deiters : on trouve de larges agrégats de glycogène dans les cellules de Hensen ainsi que dans les cellules sous-pectales et de Deiters ; des agrégats de glycogène sont également présents dans les cellules tectales, mais ils sont de moindre importance (Malgrange et al., 2002).

L'origine des IHC est moins claire. Elles pourraient posséder les mêmes précurseurs que les OHC ou être d'une autre origine. Certaines études suggèrent que leurs précurseurs se trouveraient au sein du sillon interne. Ces études portent notamment sur la surexpression de *Math1*. *Math1* est un facteur de transcription qui régule la différenciation des cellules sensorielles durant le développement cochléaire. Chez la souris, *Math1* est exprimé dès E13 dans l'épithélium dorsal du canal cochléaire sur une étroite bande de cellules, à l'endroit où va apparaître et se développer l'organe de Corti. L'expression de *Math1* va ensuite se restreindre aux seules cellules sensorielles vers E17 (Lanford et al., 2000). La surexpression de *Math1* conduit à la formation de cellules sensorielles immatures dans les tissus adjacents à l'organe de Corti, notamment dans le sillon interne (Kawamoto et al., 2003 ; Zheng and Gao, 2000).

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

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

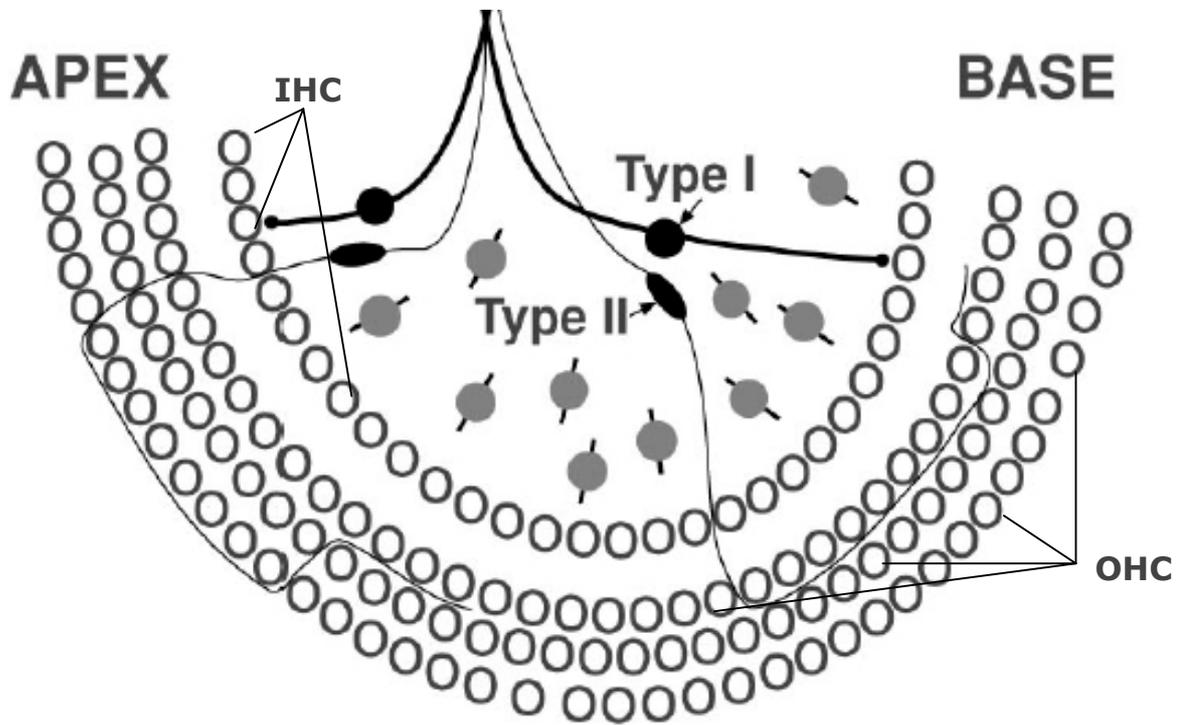


Figure 4. Représentation schématique de l'innervation afférente de l'organe de Corti. Repris de Rubel E.W. et Fritsch B., 2002. Les fibres des neurones de type I innervent chacune une seule IHC tandis que les fibres des neurones de type II innervent plusieurs OHC.

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

1.5. Objectifs

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

A partir de quelle région du canal cochléaire commence la formation de l'organe de Corti ? Quel est l'ordre d'apparition des différents types cellulaires ? A quel stade embryonnaire la première cellule de l'organe de Corti est-elle reconnaissable ? La mise en place de l'organe de Corti implique-t-il une prolifération et/ou une dégénérescence cellulaire ? Quels sont les facteurs intervenant dans la différenciation des différents types cellulaires ? Ce ne sont que des exemples de questions qui restent sans réponses précises.

Afin de tenter d'y répondre, nous nous attacherons, dans un premier temps, à décrire la structure de l'organe de Corti *in vivo* chez le rat de E16 à E19 et, dans un deuxième temps à mettre au point un système pour observer *in vitro* le développement morphologique de l'organe de Corti chez le rat de E16 à E19.

2.MATERIEL ET METHODES

2.1.1. Matériel biologique

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

2.1.2. Prélèvement de l'organe de Corti

Seize rattes gestantes et datées sont euthanasiées par placement dans une cloche où l'air est progressivement remplacé par du CO₂ (une ratte à E16, 5 rattes à E17, 5 rattes à E18 et 5 rattes à E19). Les embryons sont retirés de l'utérus et transférés dans une boîte de pétri contenant un tampon phosphate salin (PBS : 154mM NaCl ; 1mM KH₂PO₄ ; 3mM Na₂HPO₄ ; pH 7,2). Sous une loupe binoculaire, les cochlées sont retirées de la *calvaria* au moyen de pinces brucelles. Chaque organe de Corti est délicatement libéré des différents tissus qui l'entourent.

2.1.3. Mise en culture de l'organe de Corti

9 organes de Corti datés E16 et prélevés stérilement sont réservés pour la mise en culture. Ils sont déposés en explants entiers sur des membranes stériles (Millicell™, 12mm ; Millipore) déposées au fond de puits d'une plaque Nunc (24 puits) contenant du milieu nutritif Dubbelcco's modified Eagle Medium (DMEM ; Invitrogen). Placés sous atmosphère humide de 95% d'air et 5% CO₂, ils sont maintenus dans ces conditions pendant 3 jours sans renouvellement du milieu nutritif.

2.2.1. Préparation des organes de Corti pour l'observation au microscope photonique

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

2. MATERIEL ET METHODES

dernier est réalisée à une température de 60°C pendant 24 à 48 heures. Les organes de Corti mis en culture 3 jours durant suivent le même protocole qui vient d'être décrit à la différence que la fixation dans le glutaraldéhyde dure 90 minutes.

Des coupes semifines de 1 μ m d'épaisseur sont réalisées sur les blocs d'épon au moyen d'un couteau de diamant monté sur un ultratome à avance mécanique (Reichert Ultracut E). Les coupes sont colorées au bleu de toluidine (0,5% dans une solution aqueuse de carbonate de sodium 1%) et observées au microscope optique (ZEISS Axioplan).

Ce sont 4 organes de Corti datés E16, 28 datés E17, 30 datés E18 et 32 datés E19 dont 9 issus de la culture, donc au total 94 organes de Corti qui ont été observés aux 3 niveaux : base, media et apex.

2.2.2. Observation au microscope électronique à transmission

Des coupes d'une épaisseur de 700Å sont réalisées sur les mêmes blocs que ceux qui ont servi à faire les coupes semifines. Toutefois, les coupes ultrafines sont recueillies sur des grilles de cuivre recouvertes d'un film de collodion. Avant leur examen au microscope électronique les coupes ultrafines ont été contrastées pendant 5 minutes à l'acétate d'uranyle puis 5 minutes au citrate de plomb selon Reynolds (1963).

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

3. RESULTATS

3.1. Développement de l'organe de Corti in vivo

Dans la première partie de notre travail, les semifines dans la base, la media et l'apex de 85 organes de Corti prélevés chez des embryons de rat âgés de 16 à 19 jours ont été observées et examinées à l'aide d'un microscope photonique. De plus, des analyses en microscopie électronique à transmission nous ont permis de compléter et/ou de préciser certaines observations obtenues sur les coupes semifines.

3.1.1. Embryons de rat à 16 jours

3.1.1.1. Régions basale et médiane

Sur les coupes semifines dans les régions basale et médiane du canal cochléaire d'embryons de rat E16, un organe de Corti reconnaissable n'est jamais observé. A ce stade et dans ces 2 régions, l'épithélium dorsal du canal cochléaire présente une dépression qui permet de distinguer 2 parties distinctes. Une région est située du côté externe du canal cochléaire et est légèrement moins colorée par le bleu de toluidine qu'une autre localisée du côté interne (fig. 5A et 5B). Cette différence d'intensité de coloration se remarque surtout au niveau du noyau des cellules. De plus, bien que plusieurs couches de noyaux soient visibles dans les 2 parties de l'épithélium dorsal, la partie claire est constituée par 3 à 4 couches de noyaux tandis que la partie sombre en comprend 5 à 6. Sous la région pâle de l'épithélium dorsal dans le tissu conjonctif sous-jacent, nous discernons le vaisseau spiral.

Sur des coupes ultrafines, nous constatons que les cellules de l'épithélium dorsal du canal cochléaire ont une forme effilée et viennent en contact avec la membrane basale quelle que soit la région étudiée. Par contre, le pôle apical des cellules de la région la plus sombre présente de nombreuses microvillosités au contraire de celui des cellules de la région la plus claire qui ne montrent que quelques rares et courtes extensions cytoplasmiques (fig. 6A et 6B). De plus, nous remarquons que les noyaux des cellules de la région sombre possèdent une chromatine plus condensée que celle des noyaux des cellules de la région claire.

Sur les coupes semifines, des figures de mitose sont visibles dans l'épithélium le plus sombre (fig. 7) ; elles sont toujours localisées près de la lumière du canal cochléaire. Par contre, nous n'avons rencontré aucune mitose dans l'épithélium le plus clair. Quelques rares cellules dégénérantes (noyau pycnotique, nombreux grains sombres cytoplasmiques, perte de contact cellulaire) sont observées dans l'épithélium du canal cochléaire.

3.1.1.2. Région apicale

Comme précédemment indiqué dans les régions basale et médiane, l'organe de Corti n'est pas identifiable dans la région apicale du canal cochléaire chez des embryons de rat âgés de 16 jours. A ce niveau, toutefois, aucune dépression de l'épithélium dorsal du canal cochléaire n'est visible et aucune

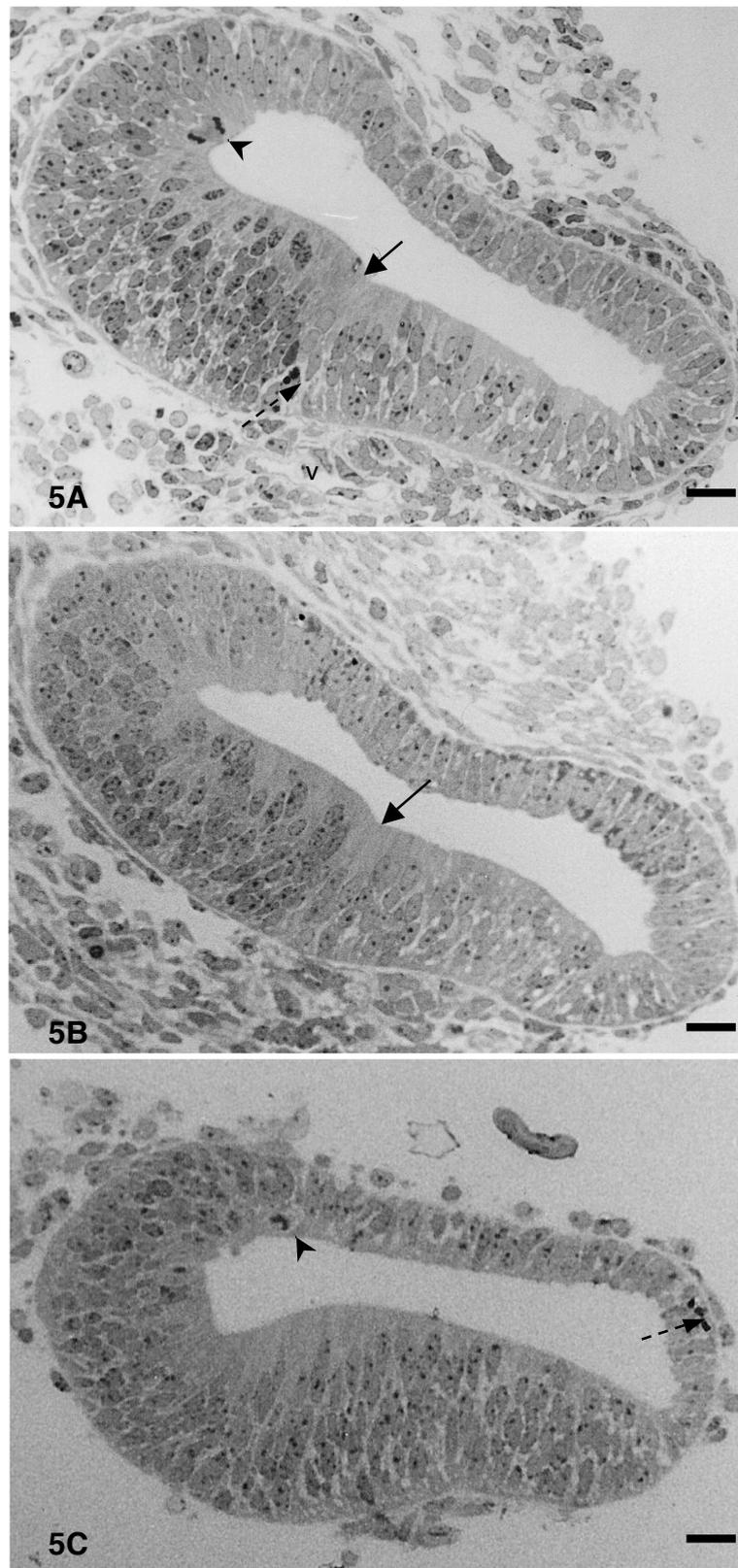


Figure 5. A : Coupes semifines dans la base du canal cochléaire au stade E16 colorées au bleu de toluidine. B : dans la média. C : dans l'apex. La partie externe du canal est située sur la droite des figures et la partie interne est située sur la gauche. Les flèches pleines indiquent la dépression de l'épithélium dorsal du canal cochléaire, les flèches en pointillés indiquent les cellules présentant des signes de dégénérescence et les têtes de flèches indiquent les figures de mitoses. Abréviation : v, vaisseau spiral. Barre : $4\mu\text{m}$

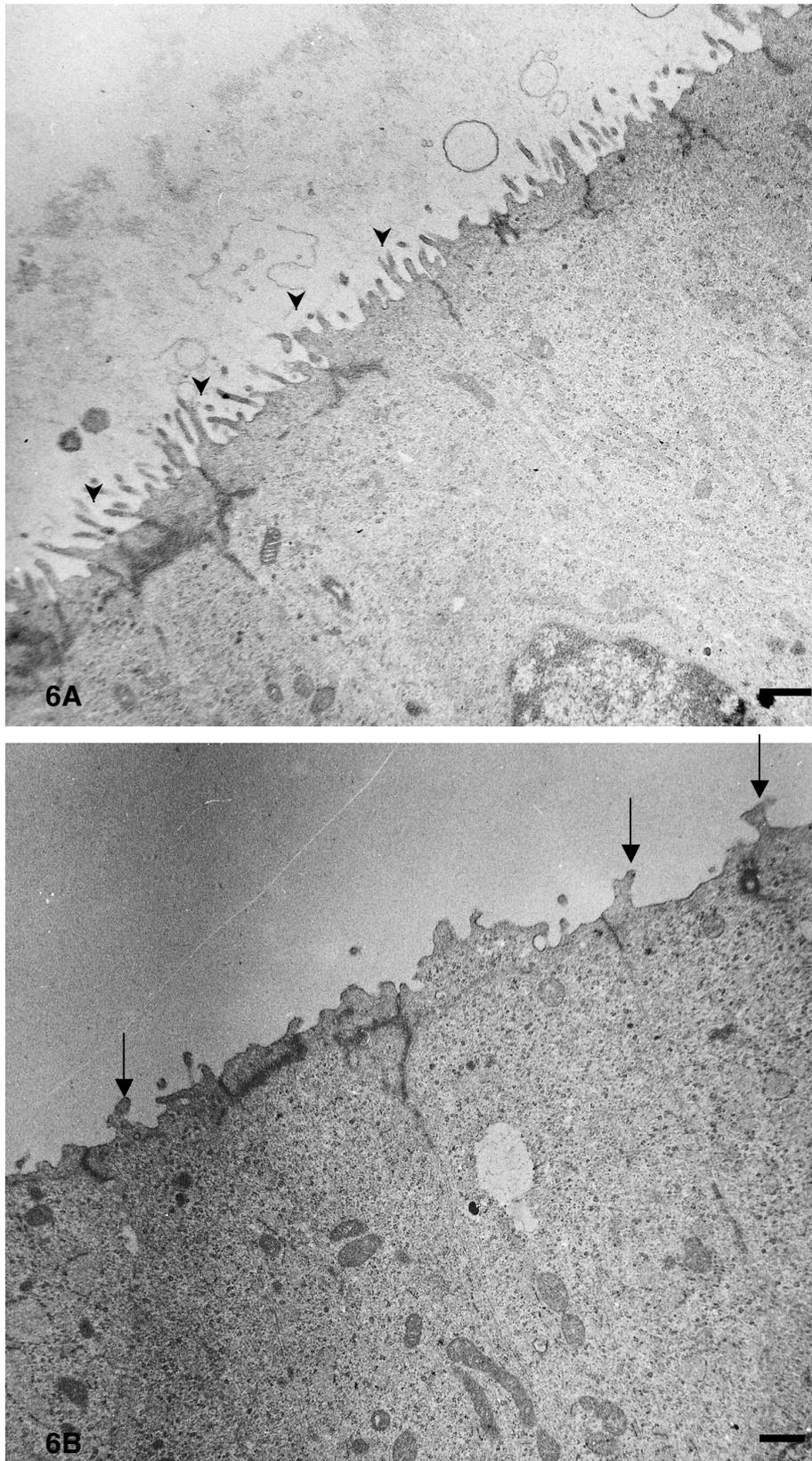


Figure 6. Portion d'une coupe ultrafine dans la base du canal cochléaire au stade E16. En A : pôle apical des cellules de la région la plus sombre de l'épithélium dorsal ; en B : celui des cellule de la région la plus claire. Les têtes de flèche indiquent des microvillosités et les flèches pleines indiquent des extensions cytoplasmiques. Barre : 1µm

3. RESULTATS

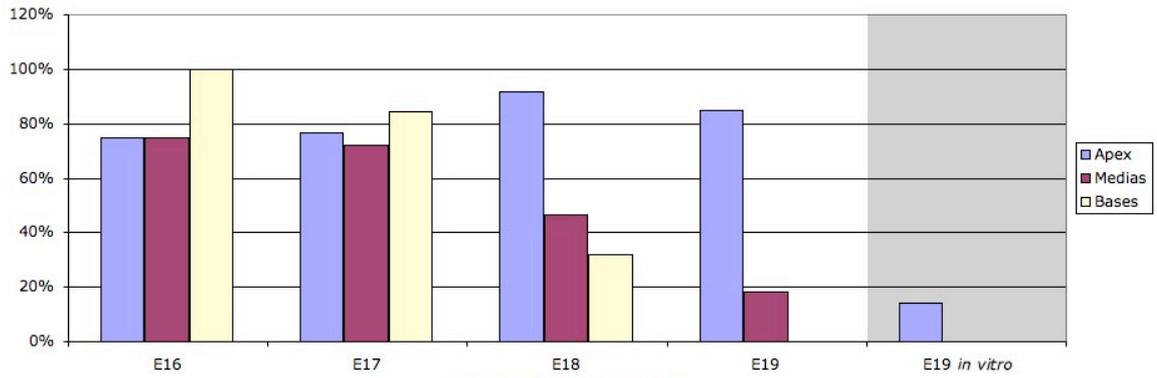


Figure 7. Histogramme représentatif du pourcentage de coupes seminales où des mitoses sont observées aux niveaux basal, médian et apical. En abscisse : stade du développement de l'organe de Corti chez l'embryon de rat de E16 à E19 *in vivo* ainsi qu'à E19 *in vitro*. En ordonnée : le pourcentage de coupes seminales où des mitoses sont observées.

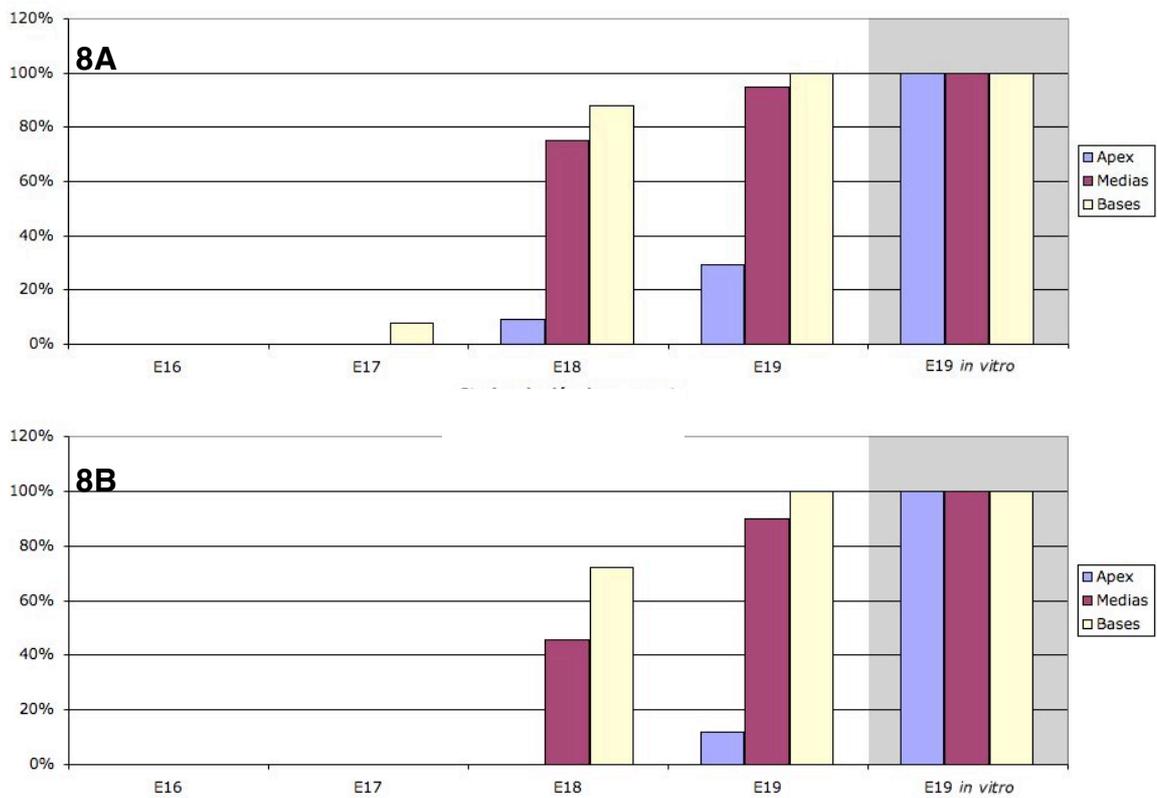


Figure 8. Histogrammes représentatifs du pourcentage de coupes où des IHC en A et des OHC en B sont reconnues aux niveaux basal, médian et apical. En abscisse : stade du développement de l'organe de Corti chez l'embryon de rat de E16 à E19 *in vivo* ainsi qu'à E19 *in vitro*. En ordonnée : le pourcentage de coupes seminales où des cellules sensorielles sont reconnues.

différence d'intensité de coloration au sein de l'épithélium dorsal n'est manifeste (fig. 5C). Ce dernier est constitué par 5 à 6 couches de noyaux.

Dans l'épithélium dorsal, des figures de mitose sont exclusivement observées dans la région située du côté interne du canal cochléaire (fig. 7). Celles-ci, tout comme au niveau de la base et de la media du canal cochléaire, sont toutes localisées près de la lumière du canal.

3.1.2. Embryons de rat à 17 jours

3.1.2.1. Région basale

La différence d'intensité de coloration qui apparaissait au sein de l'épithélium dorsal du canal cochléaire chez les embryons âgés de 16 jours, au niveau basal et médian de la cochlée, s'est accentuée dans la région basale du canal au stade E17 (fig. 9A). En effet, cette différence d'intensité de coloration s'est étendue à tout le cytoplasme des cellules. Les deux parties de l'épithélium dorsal ont perdu chacune une couche de noyaux.

De plus, dans 11,53% des coupes semifines examinées, nous notons dans l'épithélium pâle, à la limite de l'épithélium sombre, l'apparition d'une cellule qui s'étend de façon indéniable sur toute la hauteur de l'épithélium (fig. 9B). Vue au microscope photonique, son cytoplasme semble contenir un matériel très coloré par le bleu de toluidine. Observée au microscope électronique à transmission, cette cellule présente la particularité de posséder dans son cytoplasme supranucléaire de nombreux espaces formés d'un matériel non contrasté (fig. 10). Cette cellule a également un grand noyau allongé en position basale.

Sur les coupes semifines, aucun critère morphologique ne permet de discerner avec certitude les différents types cellulaires de l'organe de Corti. Dans 7,69% des coupes étudiées, c'est par l'observation de la disposition des cellules entre elles que nous reconnaissons les IHC (fig. 8A).

Le pourcentage de coupes semifines où des figures de mitose sont observées dans l'épithélium sombre est sensiblement identique à celui obtenu pour la base au stade E16 (fig. 7). Ces mitoses sont toujours localisées près de la lumière du canal cochléaire. Le nombre de cellules présentant des signes de dégénérescence reste très peu élevé.

3.1.2.2. Région médiane

Les caractéristiques morphologiques de la région médiane de l'épithélium dorsal du canal cochléaire au stade E17 semblent être à cheval entre celles observées au niveau basal au stade E16 et celles vues au niveau basal au stade E17. En effet, la différence d'intensité de coloration entre les 2 régions de l'épithélium dorsal est moins marquée dans la région médiane que dans la région basale au stade E17. Les variations du nombre de couches de noyaux dans les 2 régions de l'épithélium dorsal couvrent les valeurs observées dans les bases aux

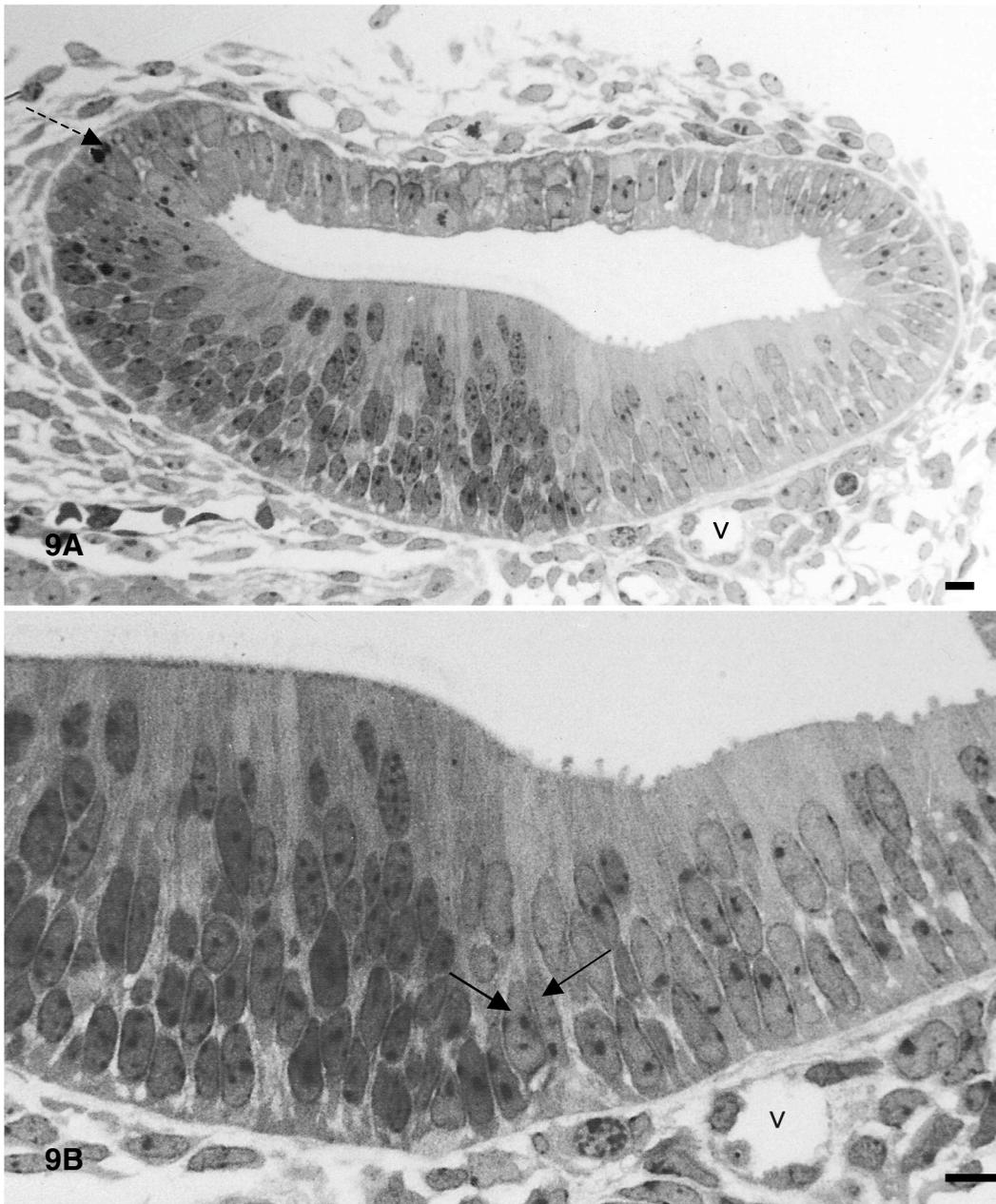


Figure 9. A : Coupe semifine dans la base du canal cochléaire au stade E17 colorée au bleu de toluidine ; la partie externe du canal se situe à droite et la partie interne à gauche. B : détail de la zone où 2 cellules s'étendent sur toute la hauteur de l'épithélium dorsal. Les flèches pleines indiquent les premières cellules s'étendant sur toute la hauteur de l'épithélium et la flèche en pointillés indique une cellule présentant des signes de dégénérescence. Abréviation : v, vaisseau spiral. Barre : 2µm.

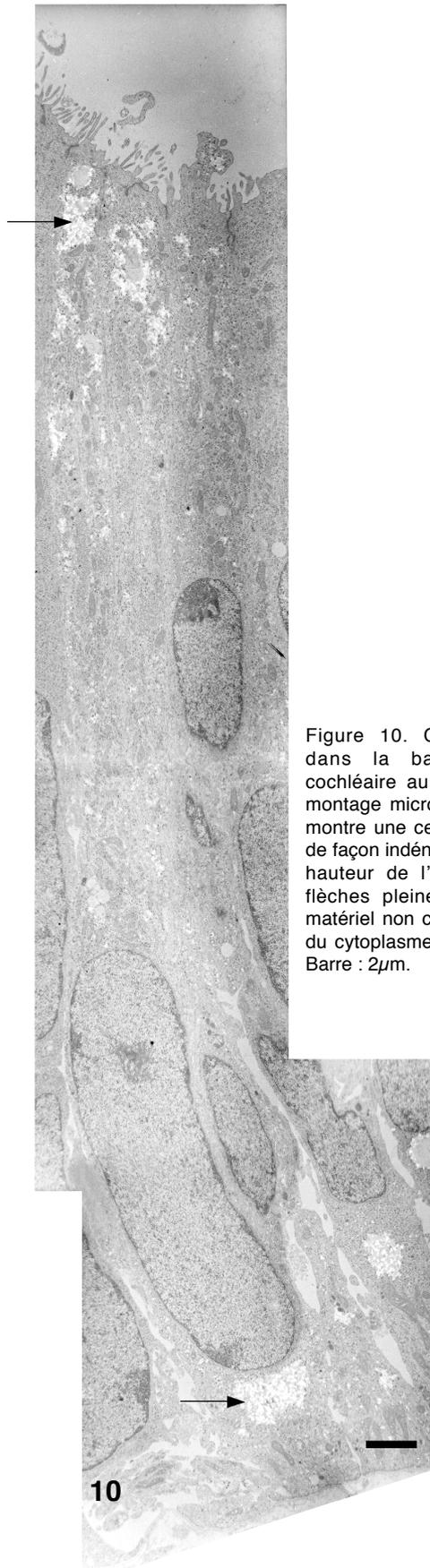


Figure 10. Coupe ultrafine dans la base du canal cochléaire au stade E17. Ce montage microphotographique montre une cellule qui s'étend de façon indéniable sur toute la hauteur de l'épithélium. Les flèches pleines montrent un matériel non contrasté au sein du cytoplasme supranucléaire. Barre : 2 μ m.

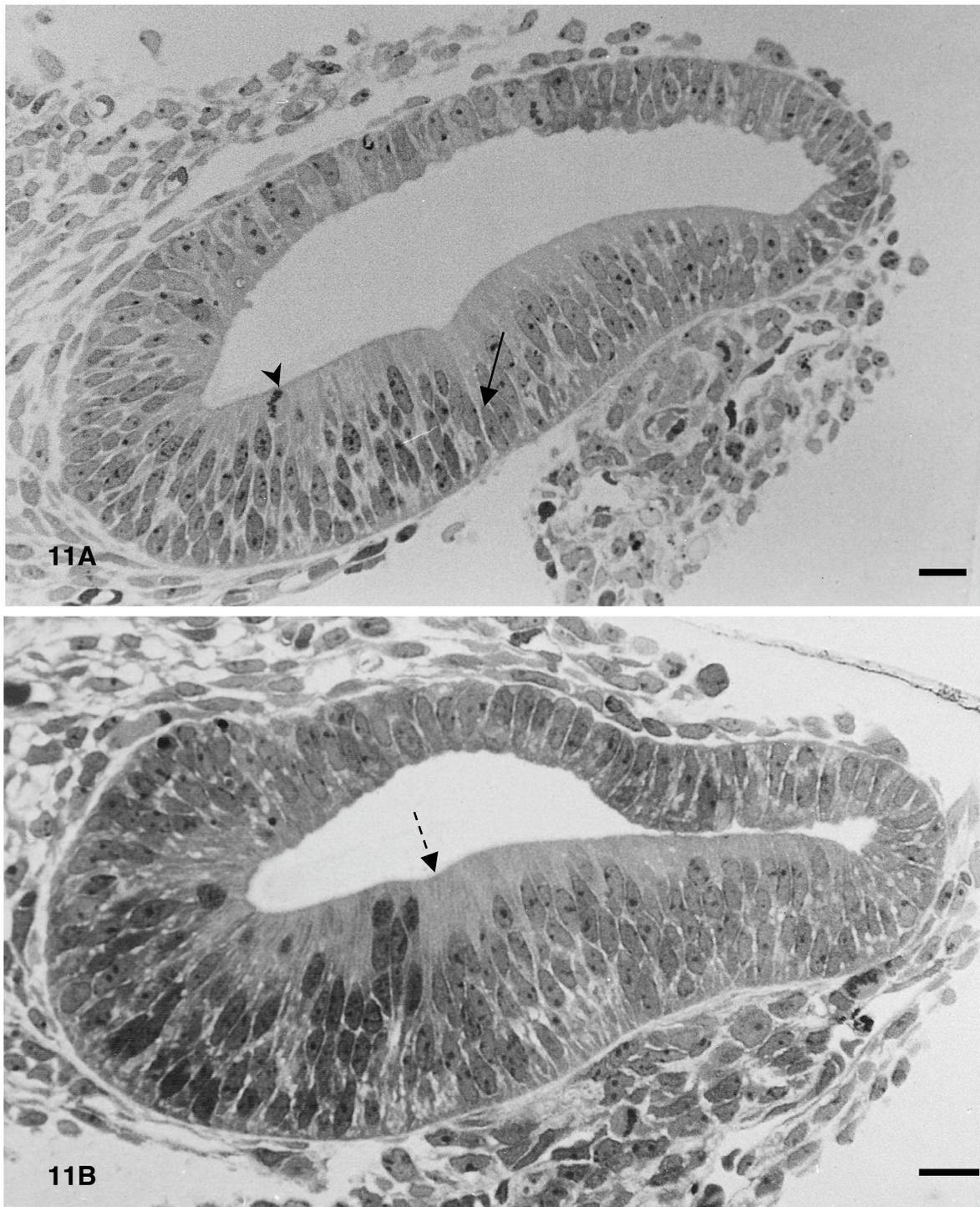


Figure 11. A : Coupe semifine dans la média du canal cochléaire au stade E17 colorée au bleu de toluidine. B : dans l'apex ; la partie externe du canal se situe à droite et la partie interne à gauche. Les flèches pleines indiquent les premières cellules s'étendant sur toute la hauteur de l'épithélium, les têtes de flèches indiquent les figures de mitoses et la flèche en pointillés montre la dépression de l'épithélium dorsal. Barre : 4 μ m

stades E16 et E17 : le nombre de couches de noyaux varie de 2 à 4 pour l'épithélium pâle et de 4 à 6 pour l'épithélium sombre (fig. 11A). Dans la média au stade E17, comme nous l'avons indiqué dans la base au stade E17, nous observons aussi la présence d'une cellule nettement visible sur toute la hauteur de l'épithélium et localisée en bordure de l'épithélium pâle au contact de l'épithélium sombre sur certaines coupes semifines. Cependant, cette observation est moins fréquente au niveau médian puisqu'elle a été obtenue seulement dans 4% des coupes semifines analysées. Enfin, contrairement aux observations faites au niveau basal, nous n'avons jamais reconnu d'IHC sur les coupes semifines réalisées au niveau médian.

Le pourcentage de coupes où nous voyons des figures de mitose dans l'épithélium sombre est sensiblement identique à celui constaté pour la média au stade E16 (fig. 7). Ces mitoses sont toujours situées à proximité de la lumière du canal cochléaire. Le nombre de cellules présentant des signes de dégénérescence reste très peu élevé.

3.1.2.3. Région apicale

La région apicale du canal cochléaire au stade E17 comporte les mêmes caractéristiques morphologiques que la région basale au stade E16 (fig.11B).

Le pourcentage de coupes où des figures de mitose sont observées est comparable à celui obtenu au niveau apical chez les embryons de rat âgés de 16 jours (fig. 7).

3.1.3. Embryons de rat à 18 jours

3.1.3.1. Région basale

Dans la région basale des canaux cochléaires chez des embryons de rat âgés de 18 jours, nous remarquons que, sur une grande majorité des coupes semifines, les différentes cellules de l'organe de Corti sont généralement reconnaissables (fig. 12A et 12B). En se basant sur leur emplacement, les IHC et les OHC sont visibles respectivement sur 88% et 72% des coupes étudiées (fig. 8A et 8B). Sur coupes ultrafines, nous confirmons que dans la région apicale les cellules reconnues comme étant des cellules sensorielles sur coupes semifines possèdent un matériel cuticulaire sous la membrane plasmique et des stéréocils immatures, critères spécifiques des cellules sensorielles (fig. 13).

Le pourcentage de coupes semifines où des figures de mitose sont observées dans l'épithélium sombre est fortement réduit par rapport aux valeurs obtenues au même niveau du canal cochléaire mais à des stades plus précoces (fig. 7). Celles-ci sont toujours présentes à la surface de l'épithélium.

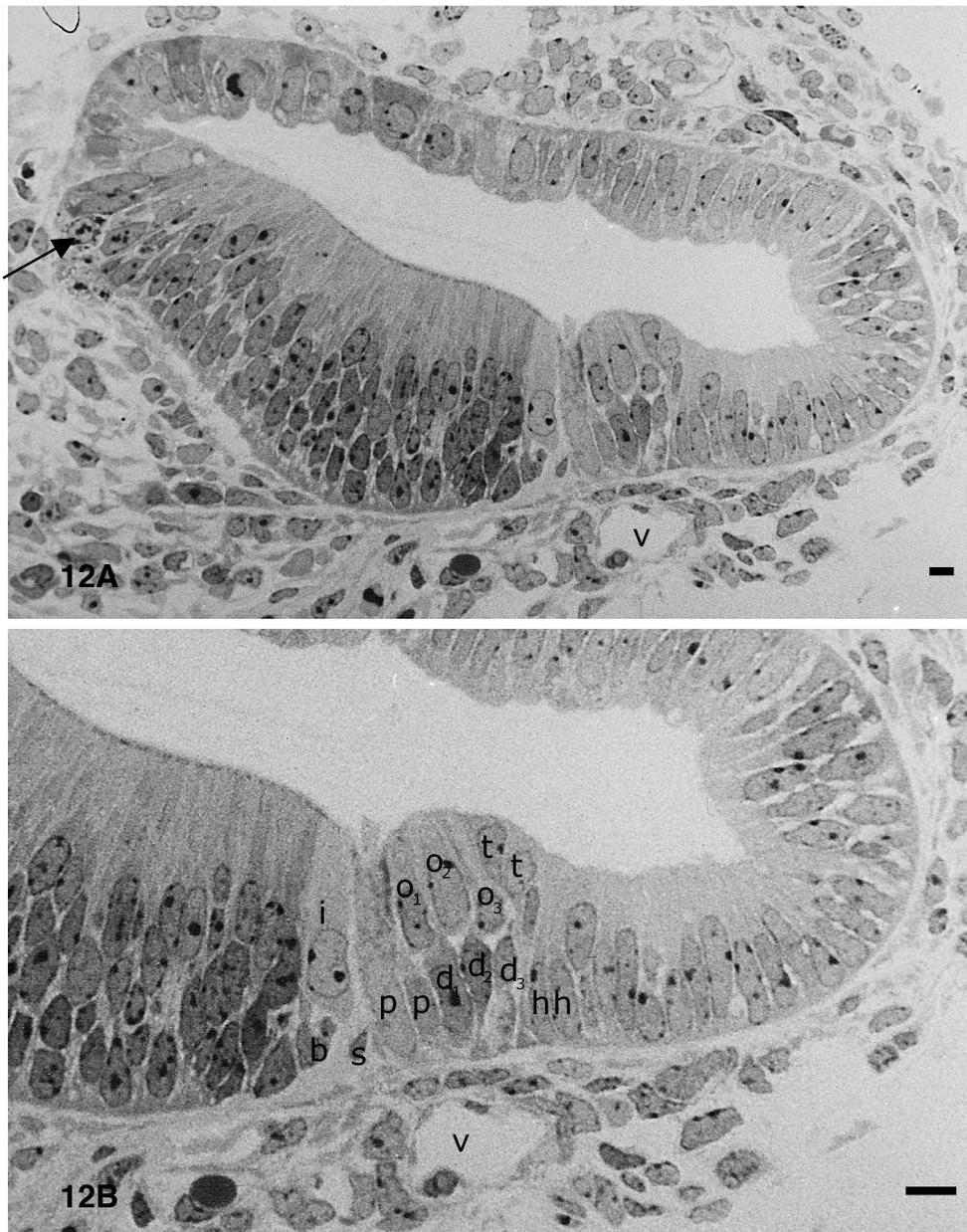


Figure 12. A : Coupe semifine dans la base du canal cochléaire au stade E18 colorée au bleu de toluidine; la partie externe du canal se situe à droite et la partie interne à gauche. La flèche pleine indique la zone où des cellules présentent des signes de dégénérescence. B : détail de la zone où les différents types cellulaires de l'organe de Corti sont visibles. Abréviations : b, cellule bordante ; $d_{1,2,3}$, cellules de Deiters ; h, cellule de Hensen ; i, cellule sensorielle interne ; $o_{1,2,3}$, cellules sensorielle externe ; s, cellule pilier ; s, cellules de soutien interne ; t, cellule tectale ; v, vaisseau spiral. Barre : $2\mu\text{m}$.

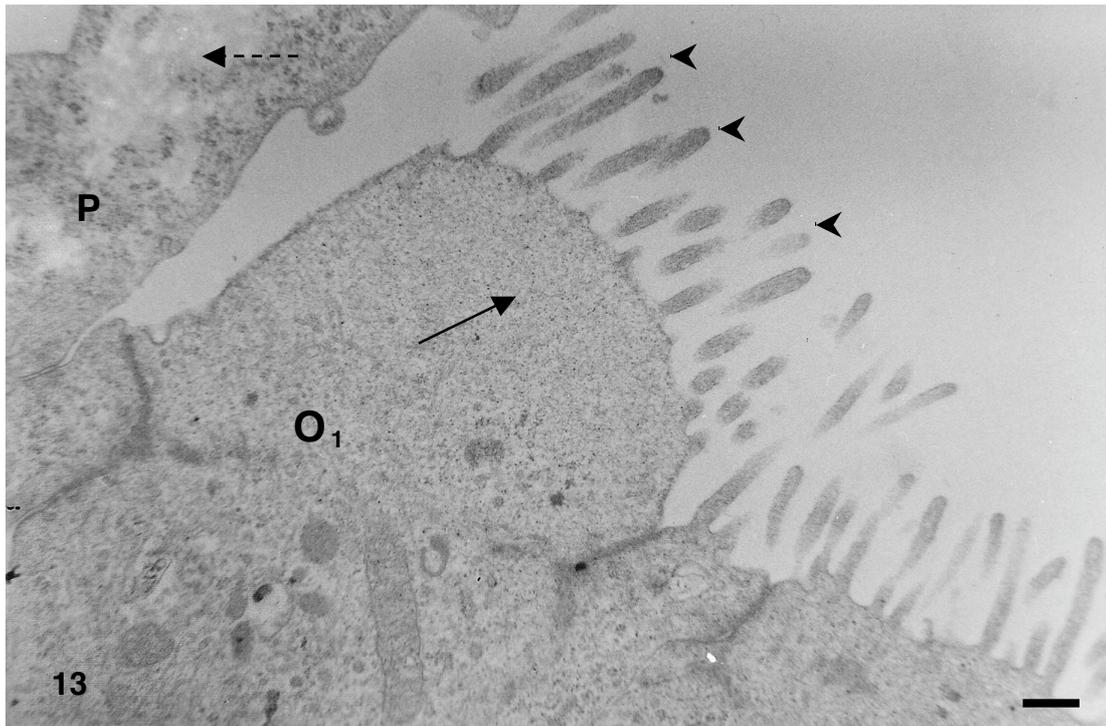


Figure 13. Coupe ultrafine dans la base du canal cochléaire au stade E18. Région apicale d'une cellule sensorielle externe, O₁. La flèche pleine indique le matériel cuticulaire sous la membrane plasmique ; les têtes de flèches montrent les stéréocils immatures ; la flèche en pointillés indique un matériel non contrasté dans le cytoplasme supranucléaire d'une cellule pilier, P. Barre : 0,5 μ m

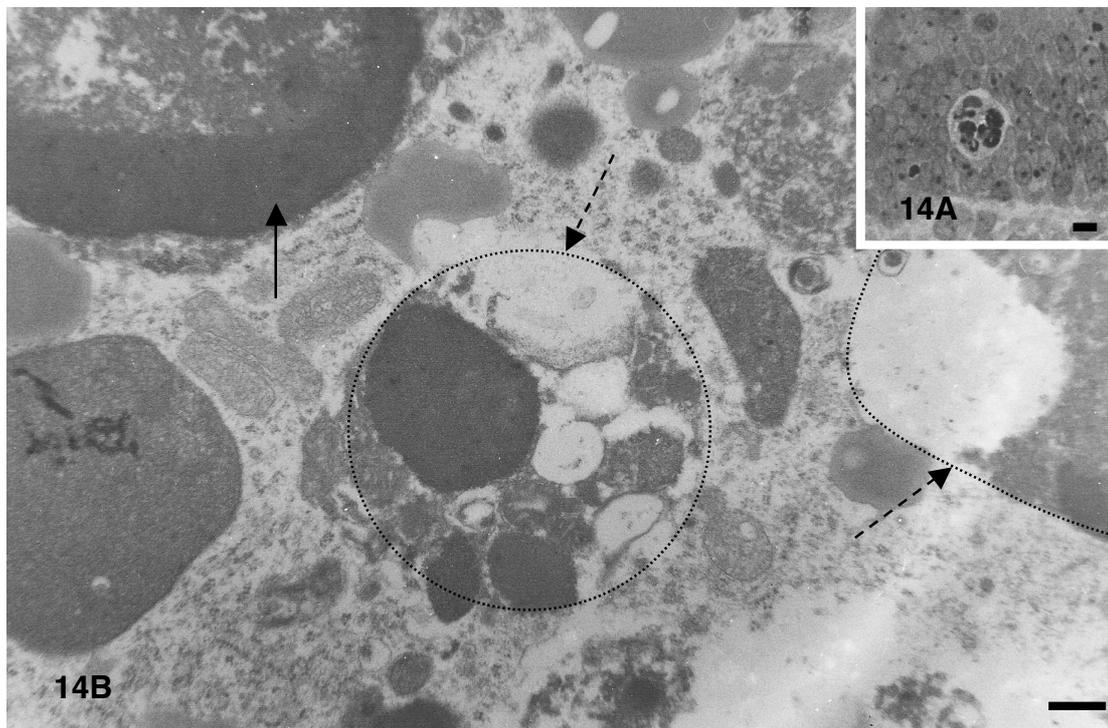


Figure 14. A : coupe semifine dans la base du canal cochléaire au stade E18, colorée au bleu de toluidine I. Zone où les cellules présentent des signes de dégénérescence. Barre : 2 μ m. B : Coupe ultrafine de la même zone, les cellules présentent des blocs de chromatine condensée (flèches pleines) ainsi que des vacuoles cytoplasmiques contenant un matériel hétérogène (flèches en pointillés). Barre : 0,5 μ m

Sur la plupart des coupes semifines observées, nous notons l'apparition d'une zone particulière où les cellules présentent des signes de dégénérescence. Cette zone est située du côté interne du canal cochléaire, proche de la transition entre l'épithélium sombre et l'épithélium simple de la face ventrale du canal cochléaire (fig. 14A). En microscopie électronique à transmission, nous observons dans cette zone des noyaux qui renferment de gros blocs de chromatine condensée ainsi que des larges vacuoles cytoplasmiques contenant un matériel hétérogène (fig. 14B).

3.1.3.2. Région médiane

Il est généralement moins aisé d'identifier l'organe de Corti et ses différents types cellulaires dans la région médiane du canal cochléaire au stade E18 qu'au niveau des bases au même stade (fig. 15A et 15B). Selon l'organisation des cellules au sein de l'épithélium, il est possible de reconnaître les IHC et les OHC respectivement dans 75% et 45,83% des coupes semifines analysées, (fig 8A et 8B).

Le pourcentage de coupes semifines où des figures de mitose sont observées dans l'épithélium sombre est réduit comparativement à celui obtenu au même niveau mais à des stades antérieurs (fig. 7).

La zone où les cellules présentent des signes de dégénérescence décrite au niveau des bases au stade E18 est également présente sur la plupart des coupes semifines étudiées.

3.1.3.3. Région apicale

La morphologie du canal cochléaire au niveau apical chez des embryons de rat âgés de 18 jours ressemble à ce qu'elle était à E17. Toutefois, la différence d'intensité de coloration est plus prononcée entre les parties interne et externe du canal cochléaire au stade E18 (fig. 16).

Le pourcentage de coupes semifines où des figures de mitose sont observées est sensiblement le même qu'au niveau apical chez des embryons de rat âgés de 17 jours.

Dans cette région, nous ne constatons aucune zone de dégénérescence.

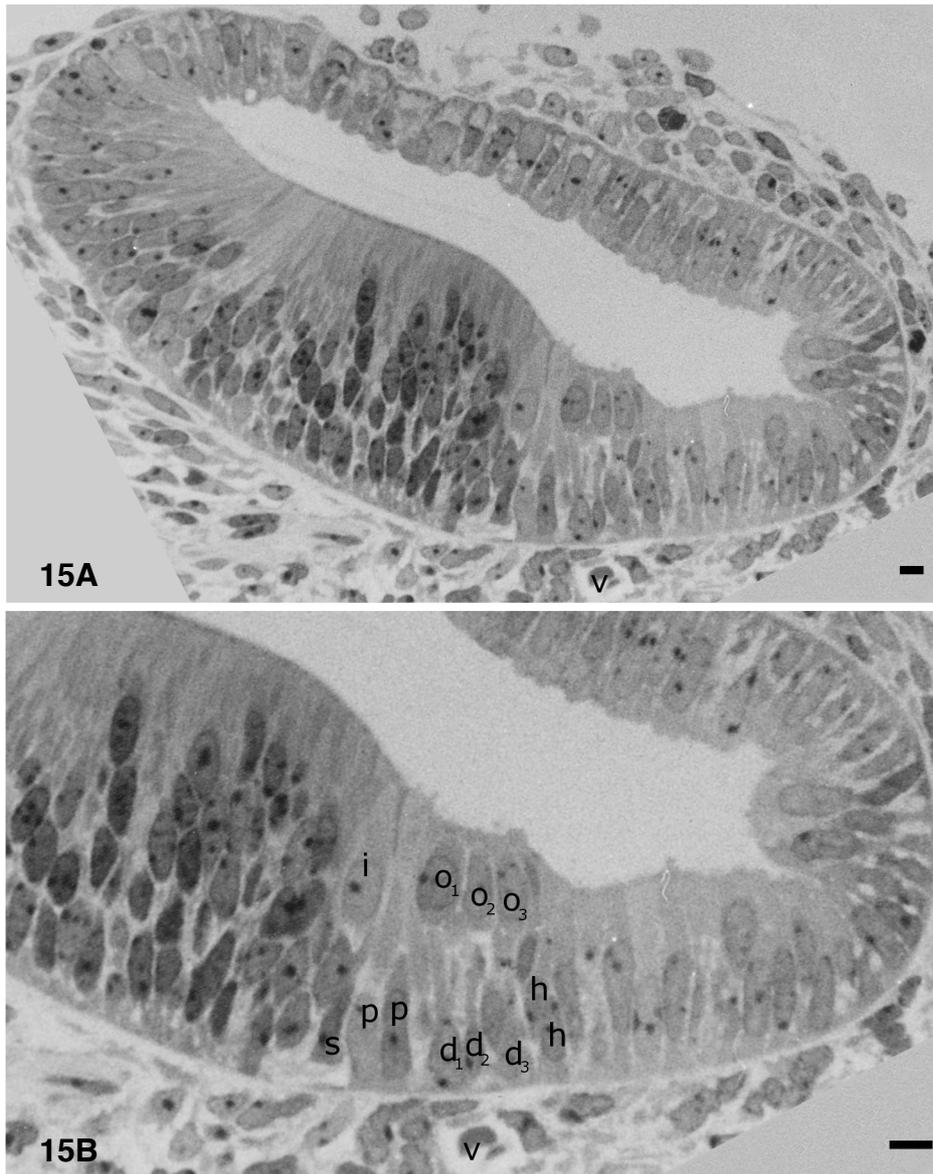
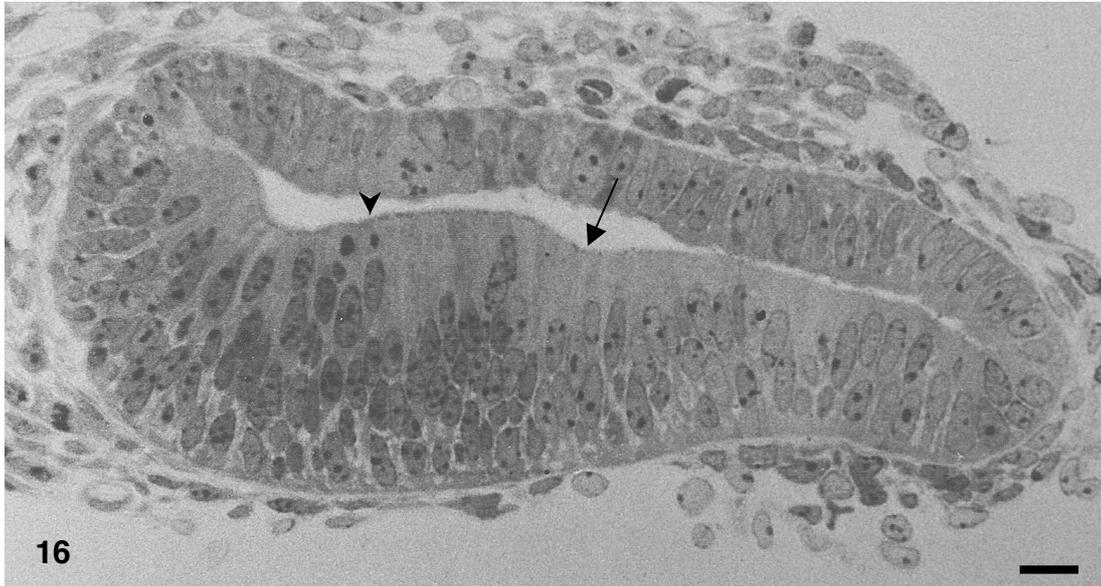


Figure 15. A : coupe semifine dans la media du canal cochléaire au stade E18 colorée au bleu de toluidine; la partie externe du canal se situe à droite et la partie interne à gauche. B : détail de la zone où les différents types cellulaires de l'organe de Corti sont visibles. Abréviations : $d_{1,2,3}$, cellules de Deiters ; h, cellule de Hensen ; i, cellule sensorielle interne ; $o_{1,2,3}$, cellules sensorielles externes ; p, cellule pilier ; s, cellules de soutien interne ; v, vaisseau spiral. Barre : $2\mu\text{m}$.



16

Figure 16. Coupe semifine dans l'apex du canal cochléaire au stade E18 colorée au bleu de toluidine ; la partie externe du canal se situe à droite et la partie interne à gauche. La flèche pleine indique la dépression de l'épithélium dorsal du canal cochléaire et la tête de flèche montre une figure de mitose. Barre : $4\mu\text{m}$.

3.1.4. Embryons de rat à 19 jours

3.1.4.1. Région basale

Dans la région basale des canaux cochléaires prélevés sur des embryons de rat âgés de 19 jours, les différents types cellulaires de l'organe de Corti peuvent être facilement identifiés. Nous distinguons les IHC et les OHC mais également les diverses cellules de soutien : les cellules de Deiters, les cellules piliers interne et externe, les cellules phalangeaires et les cellules bordantes internes. (fig. 17A et 17B).

Aucune mitose n'est observée (fig. 7) et nous retrouvons la zone où les cellules présentent des signes de dégénérescence décrite au niveau basal chez des embryons de rat à 18 jours.

3.1.4.2. région médiane

La morphologie du canal cochléaire au niveau médian chez des embryons de rat âgés de 19 jours est similaire à celle observée au niveau basal chez des embryons de rat âgés de 18 jours (fig. 18A)

Le pourcentage de coupes semifines où des figures de mitose sont observées est encore diminué par rapport à celui obtenu au niveau médian chez des embryons de rat âgés de 18 jours : il n'est plus que de 18,18% (fig. 7). La zone où les cellules présentent des signes de dégénérescence est également présente à ce niveau.

3.1.4.3. Région apicale

La morphologie du canal cochléaire au niveau apical est identique à ce qu'elle était chez les embryons de rat âgés de 18 jours (fig. 18B). L'organe de Corti n'est pas présent.

Le pourcentage de coupes où des figures de mitose sont observées reste similaire à ce qu'il était chez les embryons plus jeunes (fig. 7) et aucune zone où les cellules présentent des signes de dégénérescence n'est visible.

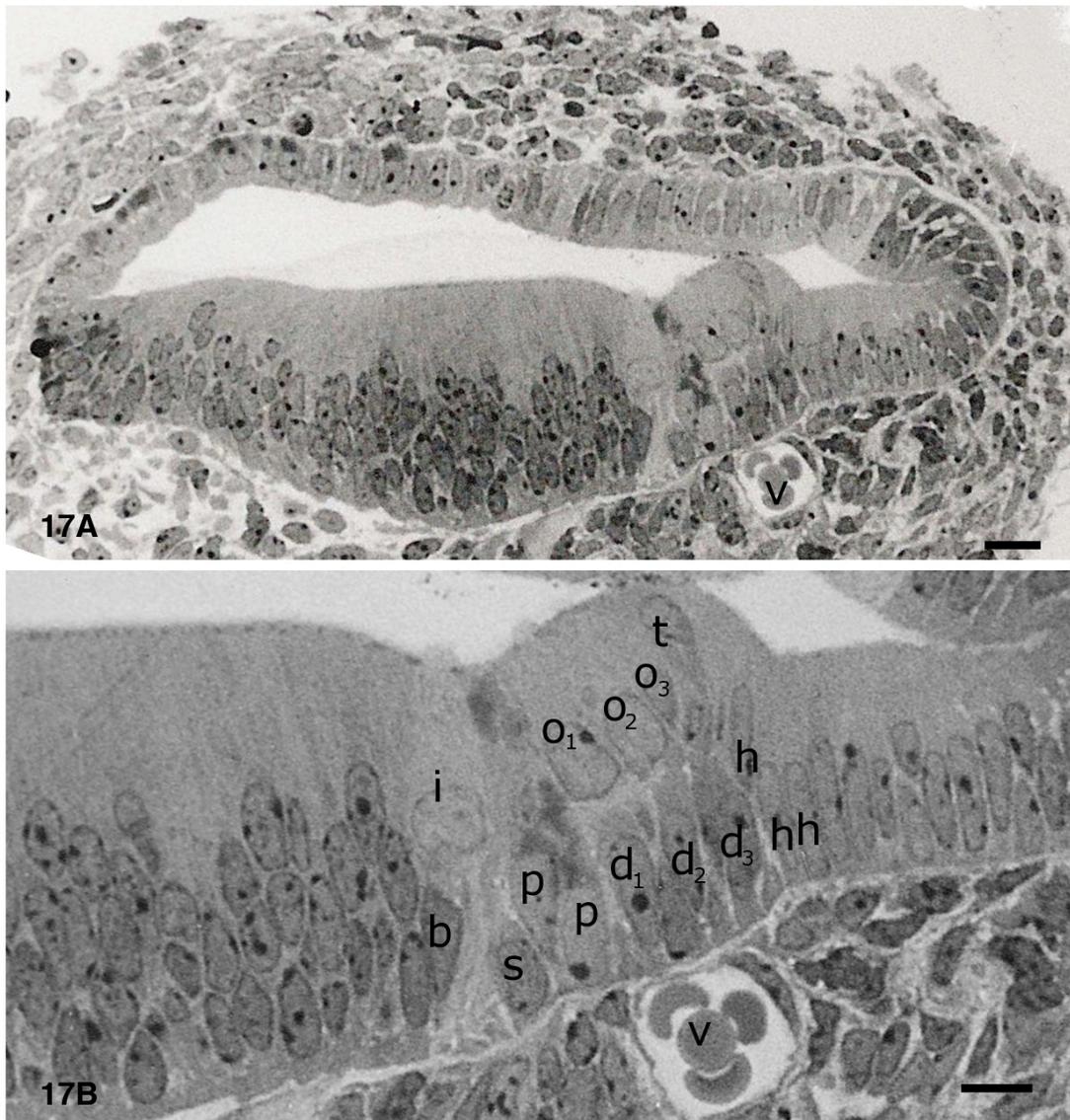


Figure 17. A : coupe semifine dans la base du canal cochléaire au stade E19 colorée au bleu de toluidine ; la partie externe du canal se situe à droite et la partie interne à gauche. B : détail de la zone où l'organe de Corti est visible. Abréviations : b, cellule bordante ; $d_{1,2,3}$, cellules de Deiters ; h, cellule de Hensen ; i, cellule sensorielle interne ; $o_{1,2,3}$, cellules sensorielles externe s ; p, cellule pilier ; s, cellules de soutien interne ; t, cellule tectale ; v, vaisseau spiral. Barre : $4\mu\text{m}$.

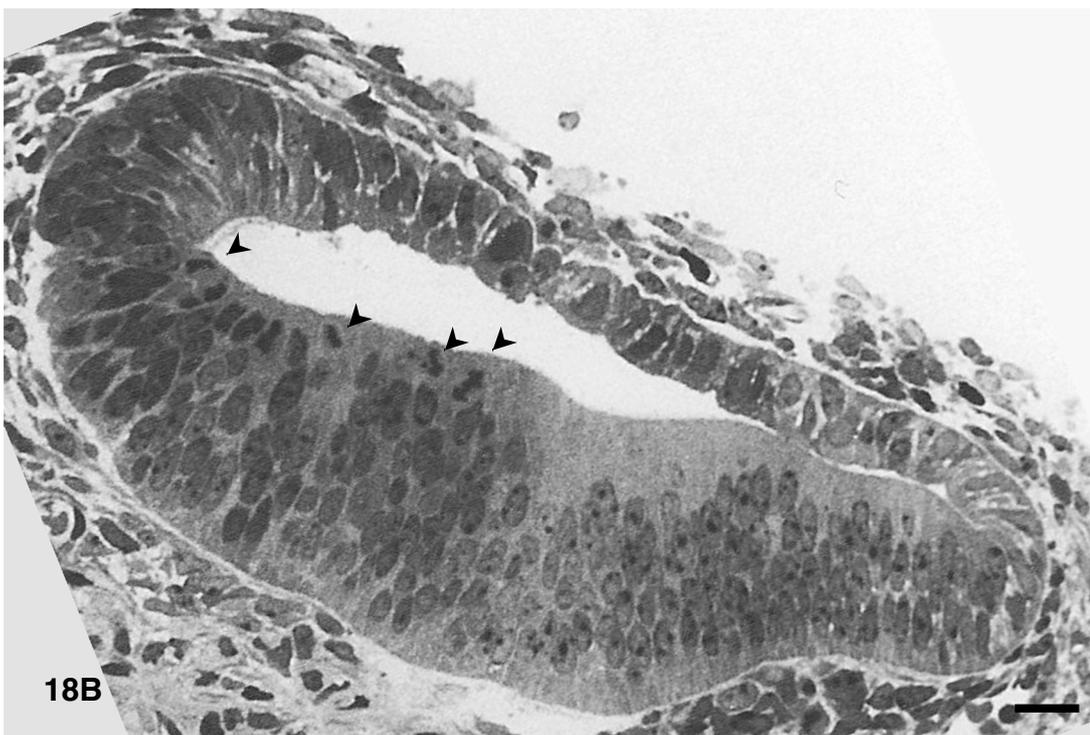
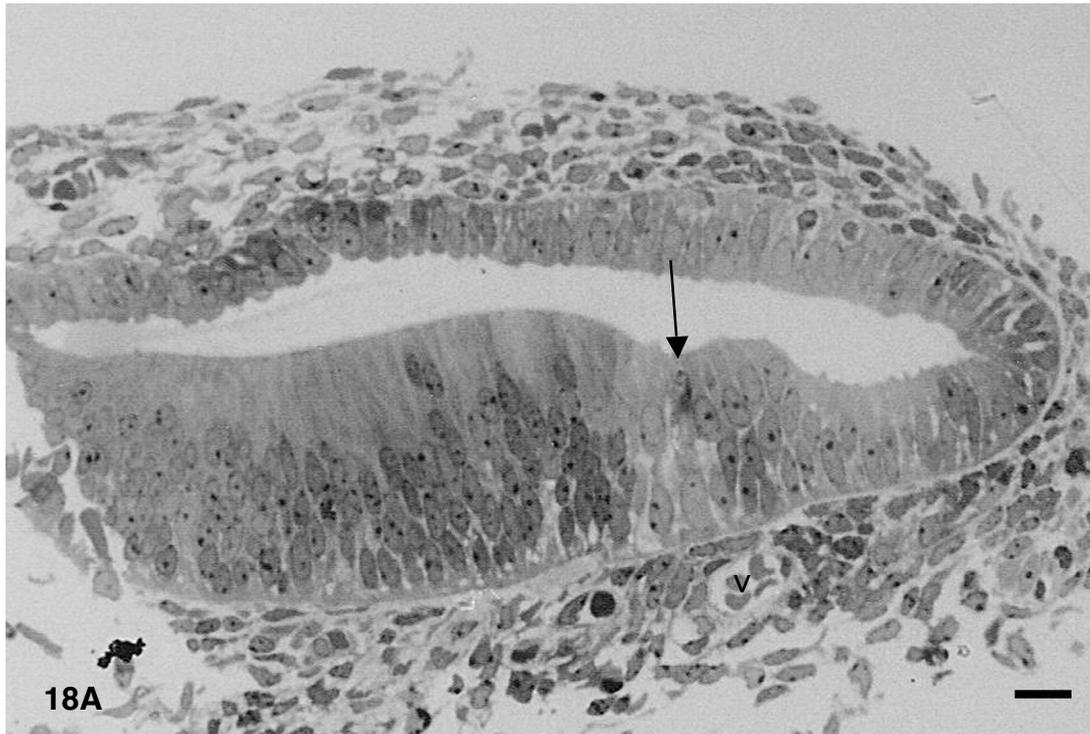


Figure 18. A : coupes semifines dans la média du canal cochléaire au stade E19, colorées au bleu de toluidine. La partie externe du canal est située sur la droite de la figure et la partie interne est située sur la gauche. B : au niveau apical. La flèche pleine indique la position des cellules piliers et les têtes de flèches montrent les figures de mitose. Abréviation : v, vaisseau spiral. Barre : $4\mu\text{m}$

3.2. Développement de l'organe de Corti *in vitro*

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons étudié en microscopie photonique les base, media et apex de 9 organes de Corti prélevés chez des embryons de rat à 16 jours et mis en culture pour 3 jours. Des analyses en microscopie électronique à transmission nous ont permis de compléter et/ou de préciser certaines observations effectuées sur les coupes semifines.

Sur les coupes semifines, la morphologie du canal cochléaire est la même, quel que soit le niveau envisagé : les différents types cellulaires de l'organe de Corti sont parfaitement reconnaissables (fig 19A, 19B, 20A et 20B). Dans ces conditions expérimentales, il apparaît des cellules sensorielles surnuméraires : dans la majorité des coupes, on retrouve 2 rangées d'IHC et 4 rangées d'OHC. Sur les coupes ultrafines, nous remarquons la présence d'une plaque cuticulaire en formation sous la surface apicale des cellules sensorielles de la base, de la média et de l'apex de la cochlée (fig. 21). De plus, nous remarquons que les cellules piliers renferment dans leur cytoplasme supranucléaire de larges espaces formés d'un matériel non contrasté semblable à celui identifié dans la première cellule qui se différencie *in vivo* au sein de l'épithélium dorsal au niveau basal chez les embryons de rat âgés de 17 jours (fig. 22).

Aucune mitose n'a été observée dans les régions basale et médiane du canal cochléaire et le pourcentage de coupes semifines où des figures de mitose ont été constatées est seulement de 14,29% au niveau apical (fig. 1). La zone de dégénérescence décrite au cours du développement du canal cochléaire *in vivo* a été observée sur quelques coupes sans toutefois atteindre l'importance qu'elle avait au stade E18 et E19 *in vivo*.

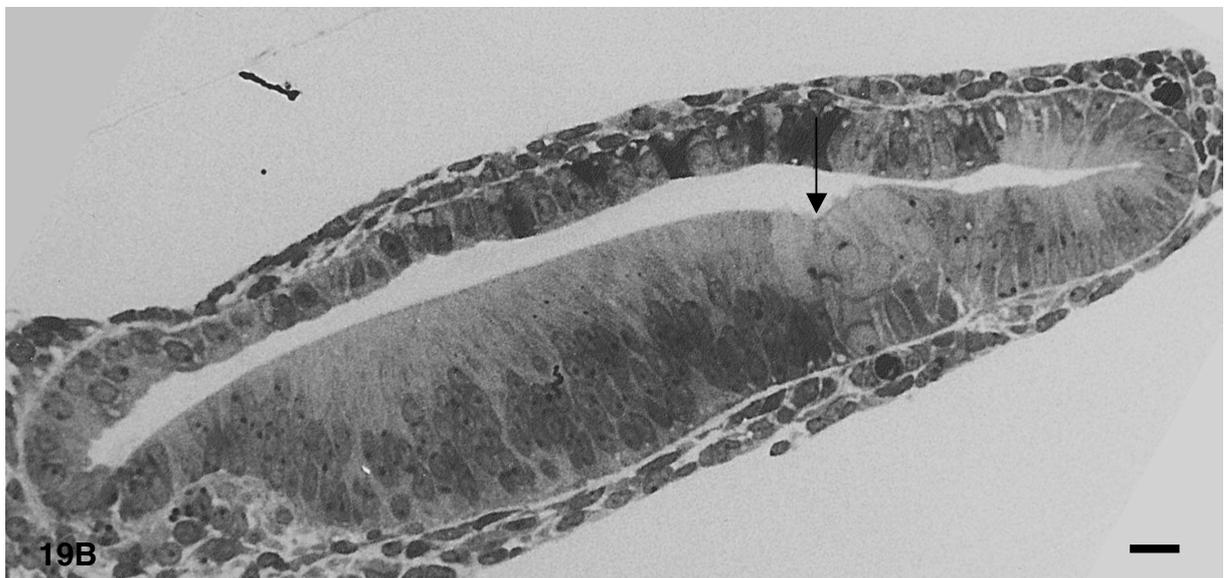
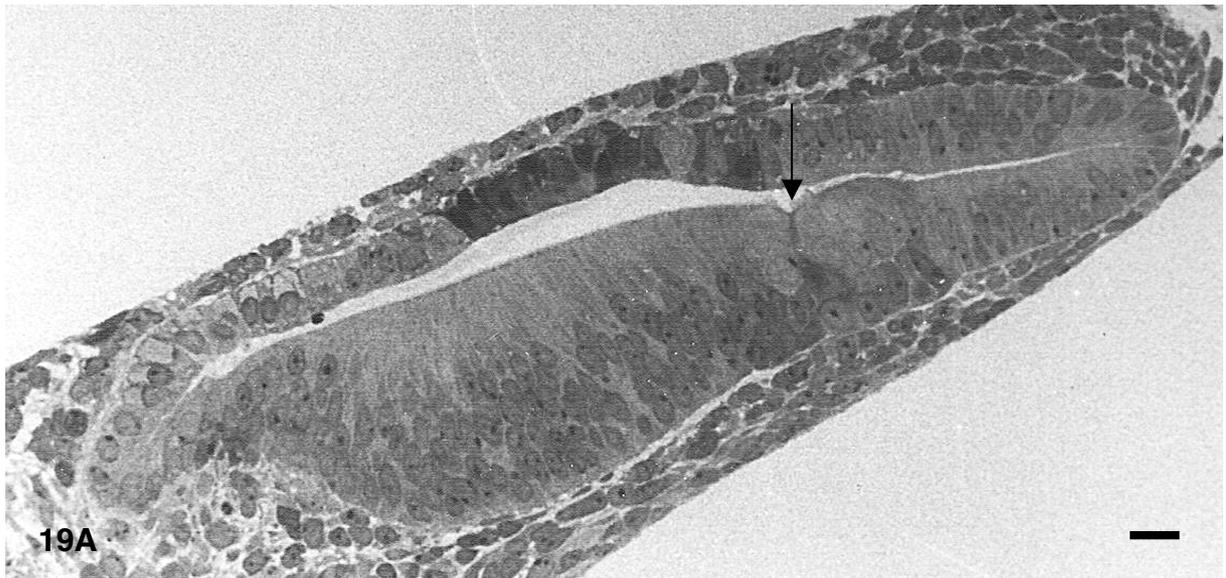


Figure 19. A : coupes semifines dans la base du canal cochléaire issu de la culture *in vitro* au stade E19, colorées au bleu de toluidine. La partie externe du canal est située sur la droite de la figure et la partie interne est située sur la gauche. B : au niveau médian. Les flèches pleines indiquent la position des cellules piliers. Barre : 4 μ m.

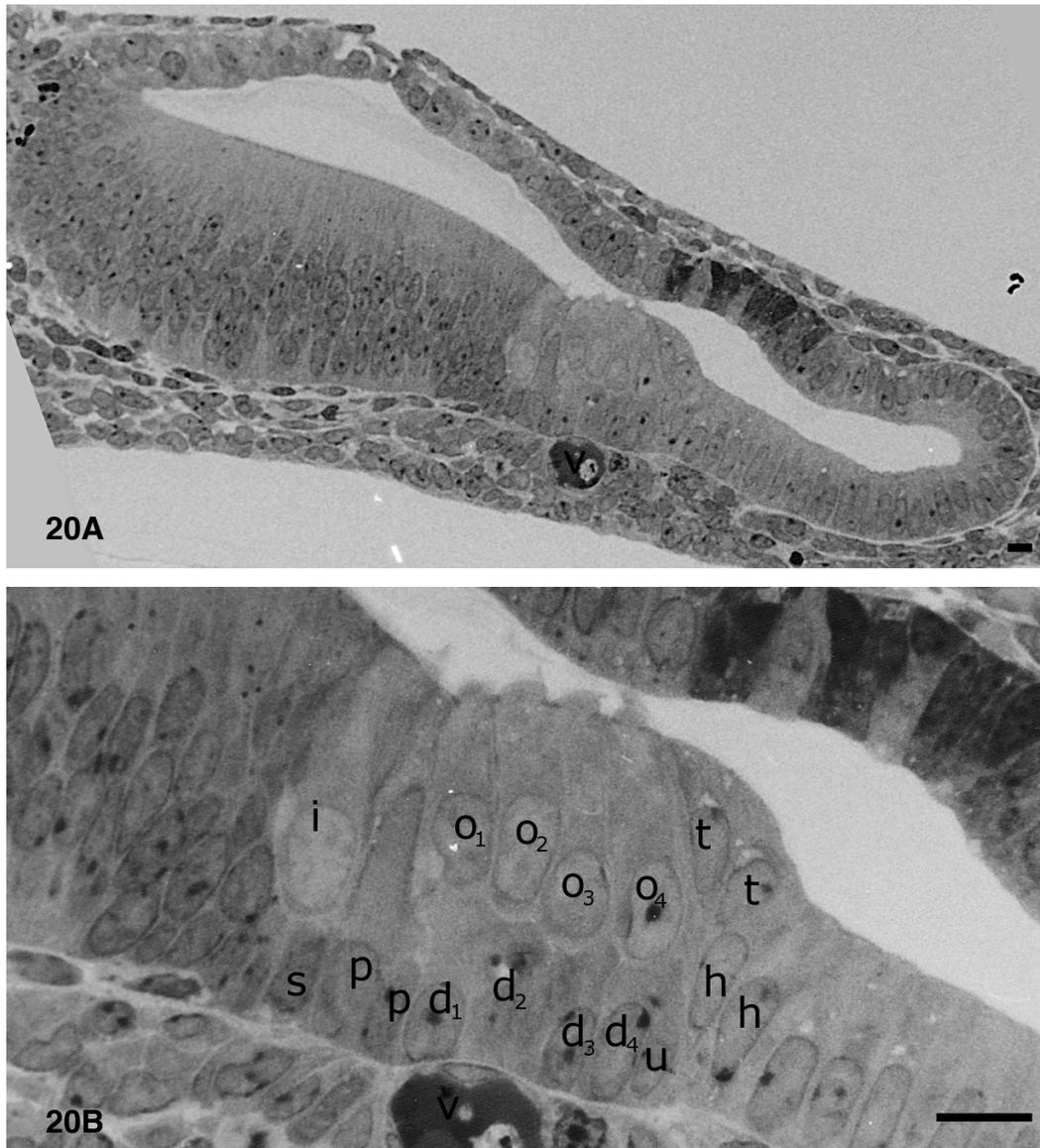


Figure 20. A : Coupe semifine dans l'apex du canal cochléaire issu de la culture *in vitro* au stade E19, colorée au bleu de toluidine; la partie externe du canal se situe à droite et la partie interne à gauche. La flèche pleine indique la zone où des cellules présentent des signes de dégénérescence. B : détail de la zone où les différents types cellulaires de l'organe de Corti sont visibles. Abréviations : $d_{1,2,3,4}$, cellules de Deiters ; h, cellule de Hensen ; i, cellule sensorielle interne ; $o_{1,2,3,4}$, cellules sensorielles externe s ; p, cellule pilier ; s, cellule de soutien interne ; u, cellule sous-TECTALE ; t, cellule tectale ; v, vaisseau spiral. Barre : $4\mu\text{m}$.

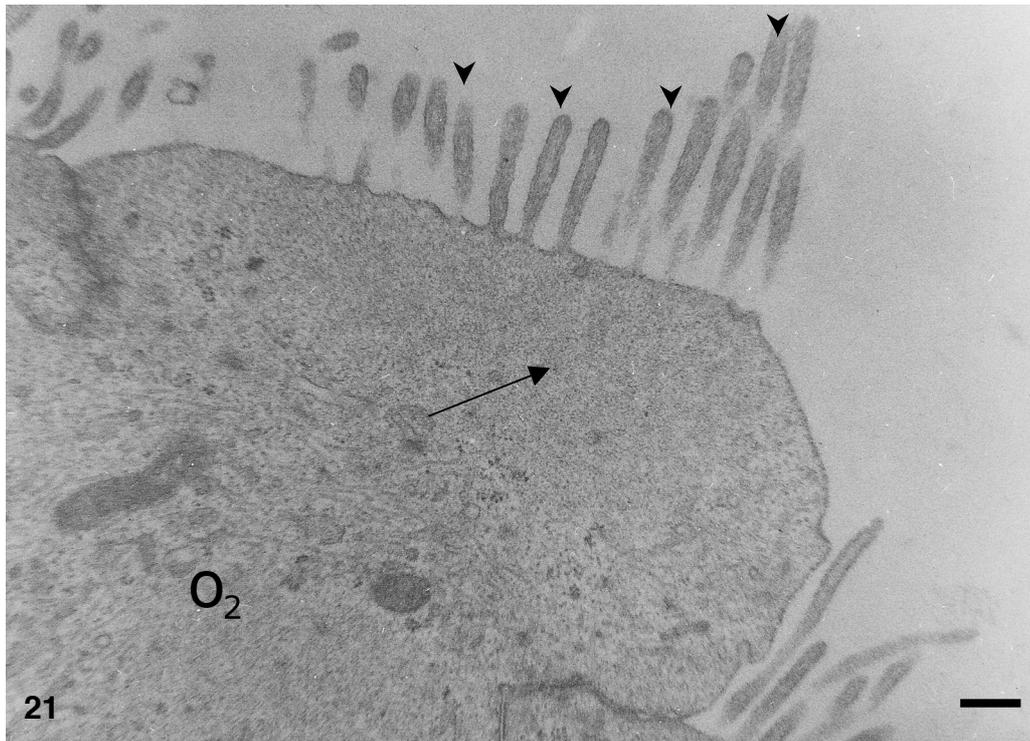


Figure 21. Coupe ultrafine dans l'apex du canal cochléaire issu de la culture *in vitro* au stade E19. Région apicale d'une cellule sensorielle externe (O₂). La flèche pleine indique la plaque cuticulaire en formation et les têtes de flèches montrent des stéréocils immatures. Barre : 0,5 μ m.

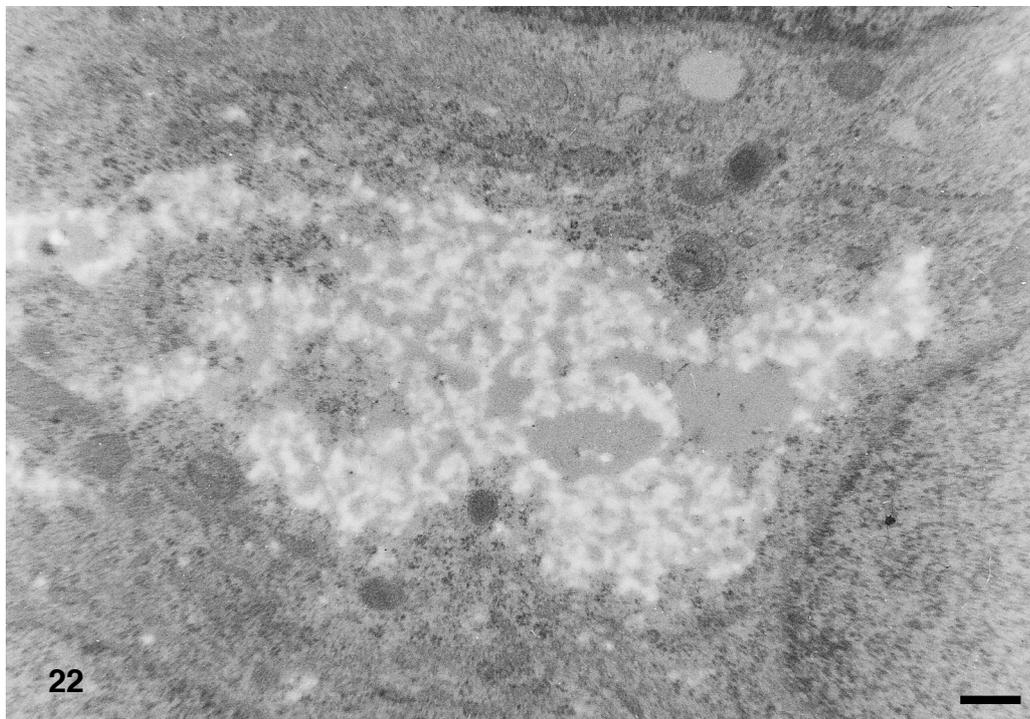


Figure 22. Coupe ultrafine dans l'apex du canal cochléaire issu de la culture *in vitro* au stade E19. Matériel non contrasté qui se trouve au sein du cytoplasme supranucléaire d'une cellule pilier. Barre : 0,5 μ m.

4.DISCUSSION GENERALE

4.1. Développement de l'organe de Corti in vivo

Sur une majorité des coupes semifines observées à E18 au niveau basal du canal cochléaire, les différents types cellulaires qui composent l'organe de Corti sont clairement reconnaissables et comme l'ont proposé des études précédentes, ce sont les IHC qui commencent leur développement avant les OHC (Kelley and Bianchi, 2001 ; Romand et al., 1993 ; Zine and Romand, 1996). Cependant, nous constatons que les différents types cellulaires de l'organe de Corti apparaissent au sein d'un épithélium pseudo-stratifié. Au stade E16, les cellules de l'épithélium de la face dorsale du canal cochléaire sont effilées et toujours au contact de la membrane basale mais le plus inattendu est la présence de mitoses au voisinage de la lumière du canal cochléaire dans l'épithélium le plus intensément coloré. Nous n'avons observé aucune mitose à proximité de la membrane basale. Rappelons que dans un épithélium pluristratifié la multiplication cellulaire a toujours lieu au niveau de la membrane basale (Junqueira et al., 1977). Dans notre cas, nous supposons que les cellules qui entrent en mitose perdent le contact avec la membrane basale et que ce sont leurs cellules filles qui se retrouvent au niveau de cette même membrane basale.

Pour la plupart des auteurs, les IHC et les OHC à la base du canal cochléaire ne sont reconnaissables que respectivement à E18 et à E20 chez le rat (Romand et al., 1993 ; Zine and Romand, 1996) : nous avons pu identifier les IHC entre E17 et E18, et les OHC dès E18 au niveau des parties basale et médiane du canal cochléaire (fig 8A et 8B). Avec les données reprises sur les figures 8A et 8B, nous montrons clairement le gradient de différenciation 'modiolar'-'striolar' (interne-externe), ce qui est en accord avec des travaux précédents (Kelley and Bianchi, 2001).

Chez le rat de E16 à E19, aucune mitose n'a été observée à l'emplacement du futur organe de Corti, ce qui est en accord avec les résultats de Ruben (1967) ; la mise en place des différents types cellulaires de l'organe de Corti, à partir de E16, n'impliquerait donc pas une prolifération cellulaire. Il est, par contre, très intéressant de comparer les tableaux des pourcentages de coupes semifines où des mitoses ont été observées dans l'épithélium le plus coloré par le bleu de toluidine avec ceux des apparitions des IHC et OHC (fig 7, 8A et 8B). Nous remarquons clairement le gradient de différenciation base-apex, ce qui confirme des travaux antérieurs effectués notamment sur d'autres animaux comme la souris ou le hamster (Kaltenbach and Falzarano, 1994 ; Mu et al., 1996 ; Rubel, 1978). Nous remarquons également que lorsque le pourcentage de coupes semifines où des mitoses ont été observées diminue, celui des apparitions des IHC et des OHC augmente. Ce résultat traduirait un rapport inverse entre une prolifération cellulaire au sein de l'épithélium sombre et la différenciation des cellules de l'organe de Corti. Pour confirmation, nous pourrions favoriser ou réprimer la prolifération cellulaire au sein de cet épithélium sombre, tout au long du développement, et voir les répercussions engendrées sur la différenciation des différents types cellulaires de l'organe de Corti.

Nishizaki et al. (1998) ont remarqué que, chez la souris, quelquefois des cellules qui dégènèrent sont groupées en un site particulier. Chez le rat, nous

avons identifié sur notre matériel à E18 une de ces zones particulières du côté interne du canal cochléaire. A l'échelle ultrastructurale, cette zone comprend des cellules riches en vacuoles contenant un matériel hétérogène et dont le noyau est pycnotique. Une exploration plus poussée est nécessaire pour identifier à quel type de mort cellulaire nous sommes confronté.

Nous avons montré que l'organe de Corti prend naissance au sein de l'épithélium dorsal, à la jonction entre une région faiblement colorée et une région intensément colorée correspondant respectivement à la petite et la grande crête épithéliale ainsi nommées par Kelley et Bianchi (2001). C'est sur la base d'une cochlée d'un stade E17 que nous avons vu apparaître la première cellule différenciée. Il s'agirait d'une cellule pilier (fig. 10). Elle occupe toute la hauteur de l'épithélium ; elle possède un gros noyau basal et son cytoplasme renferme un matériel typique des cellules piliers (figure 2A dans Malgrange et al., 2002). Notre observation implique que l'organe de Corti se développerait de part et d'autre de cette cellule pilier. Ce résultat contredit l'hypothèse selon laquelle l'organe de Corti se développerait aux dépens des cellules de l'épithélium pâle. Cette théorie découle d'une étude réalisée *in vitro* sur des OHC surnuméraires dans l'organe de Corti du rat en développement (Malgrange et al., 2002). Puisque nous supputons que l'organe de Corti se développerait bilatéralement à partir des cellules piliers, nous proposons l'existence d'une réserve de précurseurs d'IHC dans l'épithélium sombre. Cette idée confirmerait les résultats obtenus par la surexpression de *Math1* qui permet la production de cellules sensorielles immatures dans le sillon interne (Zheng and Gao, 2000 ; Kawamoto et al., 2003). De plus, nos résultats sont en accord avec le fait que des cellules nestine positive (dans la GER) peuvent *in vitro* donner naissance à des nouvelles cellules sensorielles et cellules de soutien (Malgrange et al., 2002). Rappelons que la nestine est une protéine du cytosquelette de la famille des filaments intermédiaires reconnue comme marqueur des cellules immatures comme notamment les cellules souches neuroépithéliales (Lendahl et al., 1990). Cependant, Colvin et al. (1996) ont montré que la présence de cellules piliers n'est pas indispensable à la différenciation des autres types cellulaires de l'organe de Corti. En effet, la seule anomalie morphologique des cochlées des souris invalidées pour le FGFR3 est l'absence de cellules piliers. Le FGFR3 fait partie des récepteurs aux FGFs, des facteurs de croissance, et est largement exprimé dans l'organe de Corti mature et en développement (Pirvola et al., 1995). Néanmoins, si les cellules piliers ne sont pas indispensables à la différenciation de l'organe de Corti, elles le sont à la fonction auditive : les souris invalidées pour FGFR3 sont sourdes profondes.

4.2. Développement de l'organe de Corti *in vitro*

Les explants d'organes de Corti que nous avons cultivés pendant 3 jours *in vitro*, montrent un stade de différenciation similaire à celui des organes de Corti

4. DISCUSSION GENERALE

observés *in vivo* à E19. Un simple milieu nutritif comme le DMEM suffit donc au développement des différents types cellulaires des organes de Corti prélevés à E16 et mis en culture pendant 3 jours. Nous avons constaté la présence de cellules sensorielles surnuméraires. Une telle production de cellules sensorielles surnuméraires avait déjà été montrée dans des conditions expérimentales similaires (Abdouh et al., 1993). Un dérèglement de la balance entre Math1 et des régulateurs inhibiteurs tels que HES1 et HES5 peut être à l'origine d'une surproduction de cellules sensorielles. En effet, Zine et de Ribaupierre.(2002) ont montré que, dans des souris invalidées pour HES1 et/ou HES5, Math1 est surexprimé. Cette surexpression peut conduire à la production de cellules sensorielles surnuméraire, (Kawamoto et al., 2003 ; Zheng and Gao, 2000)

Nous avons été le premier à constater que, quel que soit le niveau envisagé (base, média, apex), l'organe de Corti est aisément identifiable contrairement à ce qui s'observe *in vivo*. En effet, *in vivo*, il existe un gradient de différenciation base/apex qui se marque d'autant plus au niveau de l'apex à E19 qu'il n'y est pas encore possible de visualiser l'organe de Corti.

Un autre constat est intéressant. Nous rencontrons quelques mitoses seulement au niveau de l'apex (fig 7). Ce résultat est en accord avec notre constatation antérieure : il y a un rapport inverse entre la prolifération cellulaire et la différenciation de l'organe de Corti. Des facteurs impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire tels que les kinases cyclines-dépendantes et leurs protéines associées pourraient jouer un rôle dans la différenciation de l'organe de Corti. A l'heure actuelle peu de travaux rendent compte de leur implication dans le développement de l'oreille interne.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre travail sur l'étude du développement de l'organe de Corti *in vivo* nous a permis de répondre à certaines questions :

- nous montrons que chez le rat, la différenciation de l'organe de Corti prend son origine dans la partie basale de la cochlée ;
- nous pensons que les premières cellules différenciées qui apparaissent dans l'épithélium dorsal seraient typiques des cellules piliers;
- nous croyons que la mise en place de l'organe de Corti est indépendante d'une prolifération cellulaire au site de sa formation mais parallèle à une multiplication dans l'épithélium sombre;
- nous mettons en évidence le caractère pseudo-stratifié de l'épithélium dorsal du canal cochléaire avant E18 ;
- nous confirmons qu'il est possible de produire *in vitro* la différenciation de l'organe de Corti durant la période où tous les types cellulaires composant cette remarquable structure se mettent en place, c'est-à-dire de E16 à E19.

L'intérêt de disposer d'un modèle qui reproduit *in vitro* les transformations cellulaires aboutissant *in vivo* à la formation de l'organe de Corti est incontestable. La seule différence notable entre les développements *in vivo* et *in vitro* se situe au niveau de l'apex. Cette dernière zone représente donc une structure très particulière sur laquelle nous devons d'autant plus investiguer *in vivo*.

Nous pensons qu'il est possible ultérieurement

- de déterminer avec précision le site exact dans la base du canal cochléaire du début de la différenciation,
- d'apporter des arguments supplémentaires qui confirmeraient la nature de la première cellule différenciée,
- de qualifier la zone de dégénérescence et identifier son implication éventuelle dans le développement de l'organe de Corti,
- de connaître l'incidence éventuelle de la présence de mitoses situées dans l'épithélium sombre sur le développement de l'organe de Corti.

C'est en travaillant parallèlement *in vivo* et *in vitro* qu'il nous sera possible de suivre la différenciation de l'organe de Corti et d'en tirer des conclusions. En effet, le système de développement *in vitro* aurait l'avantage de pouvoir réaliser une étude beaucoup plus ciblée du développement de l'organe de Corti. Pour ce faire, nous doserons des facteurs de croissance ou emploierons des marqueurs de différenciation propres à un type cellulaire donné. Nous multiplierons les prélèvements au cours du temps. L'observation *in vivo* sera également poursuivie car elle demeure la référence incontournable.

6. BIBLIOGRAPHIE

6. BIBLIOGRAPHIE

- Abdouh A.**, Despres G., Romand R. 1993. *Hair cell overproduction in the developing mammalian cochlea in culture*. *Neuroreport*. **5**(1):33-6.
- Abdouh A.**, Despres G., Romand R. 1994. *Histochemical and scanning electron microscopic studies of supernumerary hair cells in embryonic rat cochlea in vitro*. *Brain Res*. **660**(2):181-91.
- Anniko M.** 1983. *Cytodifferentiation of cochlear hair cells*. *Am. J. Otolaryngol.* **4**(6):375-88.
- Arjmand E.**, Harris D., Dallos P. 1988. *Developmental changes in frequency mapping of the gerbil cochlea: comparison of two cochlear locations*. *Hear. Res.* **32**(1):93-6.
- Berglund A.M.**, Ryugo D.K. 1987. *Hair cell innervation by spiral ganglion neurons in the mouse*. *J. Comp. Neurol.* **255**(4):560-70.
- Bredberg G.** 1968. *Cellular pattern and nerve supply of the human organ of Corti*. *Acta Otolaryngol. Suppl.* **236**:1-18
- Colvin J.S.**, Bohne BA, Harding GW, et al. 1996. *Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3*. *Nat. Genet.* **12**:390-397.
- Corti A.** 1851. *Recherches sur l'organe de Corti de l'ouïe des mammifères*. *Z. wiss. Zool.* **3**:1-106.
- Ito M.**, Spicer S.S., Schulte B.A. 1995. *Cytological changes related to maturation of the organ of Corti and opening of Corti's tunnel*. *Hear. Res.* **88**:107-123.
- Junqueira**, Carneiro, Contopoulos. 1977. *Basic histology*. 2nd ed. Publication médicale (Editions Lange). 468p.
- Kaltenbach J.A.**, Falzarano P.R. 1994. *Postnatal development of the hamster cochlea. I. Growth of hair cells and the organ of Corti*. *J. Comp. Neurol.* **340**(1):87-97.
- Kawamoto K.**, Ishimoto S., et al. 2003a. *Math1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs in vivo*. *J. Neurosci.* **23**:4395-4400.
- Kelley M.W.**, Bianchi L.M. 2001. *Development and neuronal innervation of the organ of Corti*. In *Handbook of Mouse auditory research - From behavior to molecular biology* (Willott J.F., ed) pp. 137-157, CRC Press LLC, Boca Raton, FL.
- Lanford P.J.**, Shailam R., Norton C.R., et al. 2000. *Expression of Math1 and HES5 in the cochleae of wildtype and Jag2 mutant mice*. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* **1**(2):161-71.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Lendahl U.**, Zimmerman L.B., McKay R.D. 1990. *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein*. Cell **60**:585-595.
- Lenoir M.**, Puel J.L., Pujol R. 1987. *Stereocilia and tectorial membrane development in the rat cochlea. A SEM study*. Anat. Embryol. (Berl). **175**(4):477-87.
- Lenoir M.**, Shnerson A., Pujol R. 1980. *Cochlear receptor development in the rat with emphasis on synaptogenesis*. Anat. Embryol. (Berl). **160**(3):253-62.
- Lim D.J.**, Anniko M. 1985. *Developmental morphology of the mouse inner ear. A scanning electron microscopic observation*. Acta Otolaryngol. Suppl. **422**:1-69.
- Malgrange B.**, Belachew S., Thiry M., et al. 2002. *Proliferative generation of mammalian auditory hair cells in culture*. Mech. Dev. **112**:79-88.
- Malgrange B.**, Thiry M., Van De Water T.R., et al. 2002. *Epithelial supporting cells can differentiate into outer hair cells and Deiters' cells in the cultured organ of Corti*. Cell. Mol. Life Sci. **59**(10):1744-57.
- Marovitz W.F.**, Shugar J.M.A, Khan K.M. 1976. *The role of cellular degeneration in the normal development of (rat) otocyst*. Laryngoscope **86**:1413-1425.
- Morita H.**, Hoshino T., Mizuta K., et al. 1996. *Scanning electron microscopic study of the postnatal development of the rabbit cochlea, with an emphasis on innervation*. Scanning Microsc. **10**(1):165-76.
- Mu M.Y.**, Chardin S., Avan P., Romand R. 1997. *Ontogenesis of rat cochlea. A quantitative study of the organ of Corti*. Dev. Brain Res. **99**(1):29-37.
- Nakai Y.**, Hilding D. 1968. *Cochlear development. Some electron microscopic observations of maturation of hair cells, spiral ganglion and Reissner's membrane*. Acta Otolaryngol. **66**(5):369-85.
- Nishizaki K.**, Anniko M., Orita Y., et al. 1998. *Programmed cell death in the developing epithelium of the mouse inner ear*. Acta Otolaryngol. (Stockh). **118**:96-100.
- Pirvola U.**, Cao Y., Oellig C., Suoqiang Z., et al. 1995. *The site of action of neuronal acidic fibroblast growth factor is the organ of Corti of the rat cochlea*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **92**:9269-9273.
- Pirvola U.**, Ylikoski J., Virtanen I. 1990. *Immunohistochemical localization of nonerythroid spectrin (fodrin) in the sensory cells of the vestibular end organs of the rat and guinea pig*. ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec. **52**(2):127-32.
- Pujol R.**, Hilding D. 1973. *Anatomy and physiology of the onset of auditory function*. Acta Otolaryngol. **76**(1):1-10.

- Pujol R.**, Lavigne-Rebillard M., Lenoir M. 1998. *Development of sensory and neural structures in the mammalian cochlea*. In *Development of the auditory system* (Rubel E.W., Popper A.N., Fay R.R., eds) pp. 146-192, Springer-Verlag, New York.
- Raphael Y.**, Altschuler R.A. 2003. *Structure and innervation of the cochlea*. *Brain Res. Bull.* **60**(5-6):397-422.
- Reynolds E.** 1963. *The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy*. *J. Cell. Biol.* **17**:208-212.
- Roth B.**, Bruns V. 1992. *Postnatal development of the rat organ of Corti. II. Hair cell receptors and their supporting elements*, *Anat. Embryol.*, **185**:571-581.
- Rubel E.W.**, Fritsch B. 2002. *Auditory system development: Primary auditory neurons and their targets*. *Annu. Rev. Neurosci.* **25**:51-101.
- Ruben R.J.** 1967. *Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses*. *Acta Otolaryngol. Suppl.* **220**:1-44.
- Rueda J.**, Prieto J.J., Rubio M.E., Gutierrez A., Merchan J.A. 1993. *Development of the tectal cells in the mouse cochlea*. *Anat. Embryol. (Berl)* **187**(5):425-32.
- Sato M.**, Leake P.A., Hradek G.T. 1999. *Postnatal development of the organ of Corti in cats: a light microscopic morphometric study*. *Hear. Res.* **127**:1-13.
- Sher A.E.** 1971. *The embryonic and postnatal development of the inner ear of the mouse*. *Acta Otolaryngol. Suppl.* **285**:1-77.
- Spicer S.S.**, Schulte B.A. 1994. *Ultrastructural differentiation of the first Hensen cell in the gerbil cochlea as a distinct cell type*. *Anat. Rec.* **240**(2):149-56.
- Thorn L.** 1975. *The development of the organ of Corti in the guinea pig*. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* **51**(6):5-94.
- Vater M.**, Lenoir M., Pujol R. 1997. *Development of the organ of Corti in horseshoe bats: scanning and transmission electron microscopy*. *J. Comp. Neurol.* **377**(4):520-34.
- Zheng J.L.**, Gao W.Q. 2000. *Overexpression of Math1 induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears*. *Nat. Neurosci.* **3**:580-586.
- Zine A.**, de Ribaupierre F. 2002. *Notch/Notch ligands and Math1 expression patterns in the organ of Corti of wild-type and Hes1 and Hes5 mutant mice*. *Hear. Res.* **170**:22-31.
- Zine A.**, Hafidi A., Romand R. 1995. *Fimbrin expression in the developing rat cochlea*. *Hear. Res.* **87**(1-2):165-9.

6. BIBLIOGRAPHIE

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