

Génétique et physiologie cellulaire

M^{me} Christine PETIT, membre de l'Institut
(Académie des sciences), professeur

PERCEPTION AUDITIVE : DÉVELOPPEMENT ET PLASTICITÉ

Les cours et séminaires se sont décomposés de la façon suivante :

15 décembre 2011

- Cours : Développement du système auditif chez les mammifères : inné et acquis.
- Séminaire : Walter Marcotti (Dept. Biomedical Science, University Sheffield, Royaume-Uni) : *Development of mammalian cochlear hair cells: sensory-independent electrical activity vs genetic programme.*

12 janvier 2012

- Cours : Les vocalisations périnatales, premiers signaux acoustiques de la communication entre individus de même espèce.
- Séminaire : Daniele Schön (Institut Neurosciences cognitives de la Méditerranée, CNRS, Marseille) : Musique et plasticité cérébrale.

19 janvier 2012

- Cours : La plasticité du système auditif, clé d'une restauration de la fonction auditive chez les malentendants.
- Séminaire : Robert Shannon (Dept. Communication & Auditory Neuroscience, House Ear Institute & USC Biomedical Engineering, Los Angeles, États-Unis) : *Adventures in Bionic Hearing.*

26 janvier 2012

- Cours : Épilepsies déclenchées par le son et épilepsies à composante auditive : bases génétiques et modèles animaux.
- Séminaire : Patrick Chauvel (Inserm & hôpital de la Timone, université Aix-Marseille, Marseille) : Illusions et hallucinations auditives dans les épilepsies.

Développement du système auditif chez les mammifères : inné et acquis

Le cours de l'année 2011-2012 a porté sur le développement et la plasticité du système auditif. Le premier des quatre cours avait pour objectif d'examiner comment, à travers des approches qui relèvent de disciplines différentes, une compréhension du développement du système auditif se construit progressivement. De plus, le morcellement de l'émergence de ses propriétés et l'étude des changements morpho-fonctionnels concomitants des circuits neuronaux sont susceptibles d'éclairer le mode de fonctionnement du système auditif mature.

La vision traditionnelle du développement du système auditif, calquée sur celle d'autres régions cérébrales, considérait deux phases du développement, l'une précoce, durant laquelle une connectivité neuronale grossière se mettait en place, et l'autre plus tardive, durant laquelle ces connexions s'affinaient. La première phase, pensait-on, était génétiquement déterminée et indépendante de toute activité neurale, tandis que la seconde était le résultat d'interactions entre le système nerveux et l'environnement. La vision actuelle considère que l'activité neurale et la programmation génétique entretiennent un dialogue étroit dès les stades les plus précoces du développement, *via* l'activité, d'abord spontanée, puis provoquée, des neurones.

Lors du premier cours, nous nous sommes intéressés à la mise en place, chez l'homme, des performances auditives, appréciées par des tests psycho-acoustiques et objectifs, puis chez l'animal, aux éléments qui éclairent la part de l'inné et celle de l'acquis dans le développement du système auditif. Le décryptage des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents, qui a débuté il y a quelques années, a ensuite été illustré par quelques exemples.

Développement du système auditif : performances psycho-acoustiques, et maturation des circuits neuronaux (tests électro-physiologiques, données histologiques, mécanismes cellulaires et moléculaires)

Maturation des performances psycho-acoustiques et tests objectifs

Chez l'homme, la structure du système auditif est, pour l'essentiel, en place à la naissance. Sa maturation se poursuit bien au-delà, tant au niveau périphérique que central, et pour certains de ses éléments ou certaines de ses fonctions, jusqu'à l'âge adulte. Les trois compartiments de l'oreille ont des origines embryologiques différentes (Fritsch, 1998), et si la cochlée a sa taille définitive et est fonctionnellement mature à la naissance, le conduit auditif de l'oreille externe n'atteint sa taille définitive qu'une dizaine d'années plus tard. Le conduit auditif externe se forme dès la quatrième ou cinquième semaine de vie embryonnaire, et s'allonge avec l'âge. Sa fréquence de résonance baisse en parallèle ; elle passe de 4,5-5 kHz chez le petit enfant à environ 3 kHz chez l'adulte, ce qui fait glisser le seuil de sensibilité maximale de l'audition progressivement à environ 3 kHz. Quant à l'oreille moyenne, son impédance est aussi plus faible chez l'enfant que chez l'adulte.

Les noyaux et faisceaux auditifs centraux apparaissent dans un ordre spécifique (Cant, 1998) et à la huitième semaine de vie embryonnaire, le noyau cochléaire, le noyau médian du corps trapézoïde, le complexe olivaire supérieur, le lemnisque latéral, le colliculus inférieur et le corps genouillé médian du thalamus sont tous

présents. C'est seulement à la 22^e semaine de vie fœtale que les axones provenant du thalamus gagnent la plaque corticale. Avant la fin du 2^e trimestre de gestation, les connexions neuronales sont suffisantes pour que les sons déclenchent une réponse corticale. De la 25^e à la 40^e semaine, le fœtus humain devient graduellement sensible aux composants spectraux et temporels des sons. Le seuil de sensibilité aux sons purs (mono-fréquentiels) est alors élevé et, contrairement à ce que l'on observe chez l'adulte, varie peu avec la fréquence sonore. Il baisse ensuite progressivement en commençant par les hautes fréquences (sons aigus). À l'âge de deux ans, la sensibilité aux sons de haute fréquence est comparable à celle de l'adulte. La discrimination fréquentielle, c'est-à-dire la capacité à distinguer deux fréquences proches présentées séquentiellement, augmente après la naissance, et rejoint déjà celle de l'adulte pour les sons présentés pendant une durée suffisamment longue. Pour les sons brefs, elle s'accroît jusqu'à l'âge de neuf ans. À l'âge de 4 ans, la discrimination en intensité est comparable à celle de l'adulte.

La détection de la modulation en amplitude et en fréquence des sons, essentielle à la compréhension de la parole, croît en sensibilité, pour la première jusqu'à l'âge de 9 ou 10 ans, voire 12 ans, et pour la seconde jusqu'à l'âge de 8 ans, et ne varie pas au-delà. La résolution temporelle, définie par le temps minimal nécessaire entre deux événements acoustiques pour qu'ils soient perçus comme distincts, est souvent appréciée par la fonction de transfert de modulation temporelle (en anglais, *temporal modulation transfer function*). Proposé par Neal Viemeister en 1979 (Viemeister, 1979), le test correspondant consiste en la détection d'une modulation à différentes fréquences de l'amplitude d'un son à large bande. Pour les fréquences allant de 4 Hz à 50 Hz, le seuil de détection de la modulation en amplitude reste constant. Au-delà de 50 Hz, et jusqu'à 800 Hz, ce seuil croît de 3 décibels pour chaque doublement de la fréquence de modulation. La résolution temporelle est considérée comme la fréquence pour laquelle le seuil commence à se dégrader. Chez l'enfant de 6 mois comme chez l'adulte, cette fréquence est de 50 Hz.

La localisation de la source sonore gagne en précision durant les 5 premières années de vie ; l'angle minimal perceptible entre deux sources sonores passe de 25 à 2 degrés. Pour certains individus, la progression s'étend davantage.

La part de la maturation d'autres fonctions, comme l'attention, complique l'interprétation de nombreux tests, d'où le recours à des tests objectifs. L'enregistrement des potentiels évoqués auditifs, dont certains ne nécessitent pas l'attention du sujet, ni même sa vigilance, permet de s'affranchir de ces difficultés. Ils sont en général enregistrés par électroencéphalographie ou magnétoencéphalographie (les champs magnétiques produits par les courants électriques n'étant pas distordus par les milieux traversés, la magnétoencéphalographie fournit une bien meilleure localisation de l'origine des courants que l'électroencéphalographie). L'amplitude des potentiels évoqués auditifs est souvent très faible (de l'ordre d'une fraction de microvolt pour certains potentiels évoqués auditifs, alors que l'activité spontanée enregistrée sur l'électro-encéphalogramme est de l'ordre de la dizaine de microvolts). Pour détecter et analyser ces potentiels de faible amplitude alors que le bruit de fond est considérable, bruit de fond et signaux obtenus au cours de stimulations répétées sont moyennés. Le signal enregistré par des électrodes posées sur le scalp peut venir du cerveau, du tronc cérébral et aussi des nerfs auditifs.

Les trois principaux types de potentiels évoqués auditifs qui peuvent être enregistrés sont :

- les potentiels évoqués auditifs précoces ou potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral (en anglais, *Auditory brainstem response* et en abrégé ABR) : ondes survenant d'environ 1,5 ms à 7 ms après la stimulation ;
- les potentiels évoqués auditifs de latence moyenne : *middle latency response*, abrégé MLR : ondes survenant de 25 à 50 ms après la stimulation ;
- les potentiels à ondes tardives, au premier rang desquels l'onde négative de discordance (en anglais, *mismatch negativity*, abrégé MMN) : ondes survenant de 80-100 ms à 200-250 ms après la stimulation.

La détection des potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral (ABR) suppose une décharge synchrone des différentes fibres, et le parallélisme de ces fibres. La durée de chacune des ondes ABR conditionne la fréquence la plus basse du stimulus sonore pour lequel la réponse pourra être analysée : ainsi, le son le plus grave dont on peut analyser la réponse ne peut avoir une période plus longue que la durée de l'onde à analyser. Chez l'homme, on utilise un son à large bande spectrale (« clic »), qui comporte des fréquences allant de 1 ou 2 kHz à 4 kHz. Les ABR ne décèlent donc pas les atteintes qui portent sur les réponses aux sons de basse fréquence. Chez l'animal, la souris par exemple, qui entend des sons de fréquence élevée, on peut tester la réponse à de tels sons en utilisant un son de bande étroite (soit une variation d'environ 5 % autour de la fréquence centrale).

Chez l'homme, on distingue 5 ondes sur un enregistrement ABR, parfois 6. Les ondes I et II correspondent à l'activité synchrone des neurones auditifs primaires. L'onde III correspond à l'activité des cellules en buisson sphériques et globulaires du noyau antérieur du noyau cochléaire (les neurones dont le profil de décharge se maintient en plateau ne peuvent contribuer à cette onde, tandis que les cellules en buisson sphériques et globulaires ont un profil de décharge semblable à celui des neurones auditifs). Les ABR n'explorent pas la réponse du noyau cochléaire dorsal. L'onde IV est peu visible ; elle émane de la région située entre le noyau cochléaire et le lemnisque latéral. L'onde V provient du lemnisque latéral. L'onde VI, quand elle est décelée, correspond à l'activité du colliculus inférieur.

Les ABR et les réponses corticales mesurées par les potentiels évoqués auditifs corticaux (CAEP, *cortical auditory evoked potential*) sont enregistrables chez les enfants nés prématurément entre la 27^e et la 29^e semaine. Les ondes ABR n'acquièrent cependant un profil de type adulte que chez l'enfant âgé d'un an ; l'onde II, par exemple, n'est systématiquement décelable qu'à partir d'un mois. Cependant, ces tracés ABR se distinguent des tracés observés chez l'adulte par les latences des pics et les délais entre pics. Ils diminuent avec la myélinisation, qui accélère la conduction neuronale et est essentielle pour obtenir une réponse synchrone. La myélinisation progresse de façon centripète. La latence de l'onde I atteint sa valeur adulte à l'âge de 2 à 3 mois, celle de l'onde V diminue jusqu'à l'âge de 2 ans, voire 3 ou 4 ans. La myélinisation débute assez tardivement, autour de la 27^e semaine de gestation dans le système auditif central, et elle se poursuit après la naissance (Moore & Linthicum, 2007).

Les potentiels de latence moyenne sont enregistrés chez des individus vigilants ; un certain degré d'éveil est requis ainsi qu'un environnement calme. Leur intérêt majeur est de permettre d'explorer la réponse pour chaque fréquence et de tracer « un audiogramme objectif ». Les tracés comportent une onde négative « Na », qui suit immédiatement l'onde positive V des ABR ; son origine est discutée, sans

doute thalamique ou corticale. Elle est suivie d'une onde positive (Pa), qui survient environ 30 ms après la stimulation et provient des deux cortex auditifs. Puis on note des ondes Nb et Pb, Nc et Pc, dont la signification est mal connue. La nomenclature des ondes de l'adulte ne s'applique pas à l'enfant tant les changements des formes d'ondes sont considérables. Ces ondes deviennent semblables à celles de l'adulte entre 10 et 14 ans.

Les dernières ondes sont des ondes corticales. Elles sont de deux types : les ondes lentes et les ondes tardives. Les ondes lentes correspondent à la séquence P1-N1-P2. L'onde N1, dite aussi onde N100, est une grande onde négative qui survient, comme l'indique sa nomenclature, environ 100 ms après la stimulation sonore. Elle est enregistrée dans la région frontale centrale du scalp. Elle est souvent évoquée sous la forme d'un complexe, N100-P200 ou N1-P2. L'onde N100, est également provoquée par d'autres stimulations sensorielles. Dans le système auditif, elle est produite par une population neuronale située dans le cortex auditif primaire et des neurones des cortex auditifs associatifs. Son amplitude varie avec l'intensité sonore, l'intervalle de stimulation entre les sons, et la comparaison entre la fréquence et l'amplitude d'un son et celles du son précédent. Elle est liée au degré d'éveil et d'attention. Ces ondes permettent d'obtenir un audiogramme objectif. Chez le jeune enfant, une onde N100 se développe lentement entre l'âge de 1 et 4 ans, tandis que prédomine une onde « P100 ». Puis apparaît une onde N200, qui domine les potentiels évoqués jusqu'à l'adolescence, et serait identique à l'onde N100 de l'adulte. La forme adulte du complexe N100-P200 se développe après l'âge de dix ans.

Parmi les ondes tardives, nous nous sommes intéressés à celle qui correspond à la « négativité de discordance ». Ce potentiel évoqué a été découvert par le finlandais Risto Näätänen en 1978 (Naatanen *et al.*, 1978). Même si son amplitude peut être modulée par le degré d'éveil et d'attention, ce potentiel traduit pour l'essentiel la réponse automatique et inconsciente à tout type de discordance introduite dans un signal sensoriel régulier. Il est particulièrement bien documenté dans le système auditif, et à un degré moindre dans le système visuel. En règle générale, le sujet est mis en présence d'un signal répété, dont la monotonie est rompue par modification de l'un de ses paramètres. La différence dans les réponses provoquées par l'un et l'autre signal se traduit par l'apparition d'une large onde négative sur l'électroencéphalogramme, 100 à 250 ms après la rupture de la régularité du signal. Cette grande onde négative, qui suit de très près l'onde N1 et apparaît pour n'importe quel changement acoustique qui rompt l'homogénéité d'une séquence sonore, séquence simple ou complexe, avec des variations portant sur la hauteur, la durée, ou l'intensité des sons ou la localisation de la source sonore, est un remarquable outil pour une évaluation objective de la perception des paramètres acoustiques. Son amplitude est corrélée à l'importance de la discordance. La négativité de discordance est mise à profit pour étudier la perception des sons à tout âge, y compris chez le nourrisson endormi. Notons que si le test est pratiqué chez un adulte éveillé, la présence de cette onde ne s'accompagne pas nécessairement d'une aptitude à expliciter la nature de la différence introduite dans le signal. À titre d'exemple, une irrégularité dans une suite ascendante de sons chez un enfant crée une négativité de discordance à partir de l'âge de 4 mois. La négativité de discordance est aussi utilisée pour mettre en évidence la discrimination des syllabes. Une autre onde négative plus tardive, survenant entre 300 et 550 ms après la stimulation, appartient aussi à la réponse « négativité de discordance » : elle traduit une discordance dans

une étape ultérieure du traitement des stimuli auditifs, par exemple pour la parole, à une étape phonologique ou lexicale. Ces deux ondes tardives changent de forme et de latence de la naissance à l'adolescence, voire au-delà. Enfin, il existe des ondes tardives positives comme l'onde P300, qui nécessite un certain degré de conscience du sujet, et acquiert un profil adulte vers l'âge de 20 ans.

L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (*IRMf*) est aussi une méthode d'analyse possible dès la naissance ; elle permet une bonne résolution spatiale des zones impliquées dans les tâches perceptives.

Mise en place de la connectivité du système auditif, établissement et maturation de la tonotopie : rôle de l'activité électrique spontanée et provoquée par le son, mécanismes cellulaires et moléculaires

Les questions auxquelles nous nous sommes intéressés sont les suivantes : quel est l'ordre d'établissement des diverses connexions synaptiques dans le système auditif durant le développement ? Sont-elles dépendantes de l'activité spontanée des neurones ou des cellules sensorielles ? Quand la tonotopie se met-elle en place dans les différents noyaux ? Quelles sont les étapes du développement qui sont influencées par l'activité neuronale provoquée ?

Seules des réponses très partielles peuvent aujourd'hui être apportées à ces questions. Une approche génétique, permettant de visualiser les neurones auditifs primaires chez la souris au quinzième jour embryonnaire (E15.5¹), a conclu que la formation des synapses centrales de ces neurones avec les neurones en buisson du noyau cochléaire précède d'environ une journée la formation de leurs synapses périphériques avec les cellules sensorielles auditives (Koundakjian *et al.*, 2007). Des molécules de guidage interviennent dans la migration des dendrites et axones des neurones auditifs primaires, mais la présence de leurs cibles cellulaires ne semble pas indispensable à cette étape. Une tonotopie des projections centrales est d'emblée établie, par un mécanisme non élucidé ; un rôle possible d'interactions entre axones, comme dans le système olfactif, a été évoqué. Les synapses que forment les terminaisons axonales des neurones auditifs primaires sont volumineuses : elles sont dites en bulbes terminaux (en anglais, *end-bulbs of Held*) ; ce sont en réalité des calices qui, par leur taille, sécurisent la transmission synaptique, ce qui permet de maintenir la fidélité temporelle du signal électrique. Ces calices sont particulièrement développés autour des corps cellulaires des cellules en buisson sphériques de la partie la plus antérieure du noyau cochléaire ventral. La taille de ces synapses paraît être en rapport avec l'activité synaptique. Chez les animaux sourds par atteinte cochléaire, elle est réduite, et redevient normale après implantation cochléaire (étude chez le chat). De plus, des neurones auditifs primaires dont le taux de décharge spontanée est élevé (neurones « à bas seuil ») forment de larges calices, et ceux dont le taux de décharge spontanée est faible, de petits calices. Une étude réalisée chez le chat, avec marquage des neurones auditifs primaires par la neurobiotine (Leake *et al.*, 2002), a montré que leurs projections tonotopiques dans

1. Des souris transgéniques exprimant la recombinase cre inducible par le tamoxifène, sous le contrôle du promoteur du gène codant pour le facteur de transcription neurogénine-1 (Ngn1-CreERT2), qui s'exprime dans les neurones auditifs primaires, étaient croisées avec les souris Rosa26Reporter de sorte que, dans leur descendance, la β -galactosidase s'exprimait, dans cette région, dans ces seuls neurones.

le noyau cochléaire s'affinent entre la période néonatale et l'âge adulte. D'autres travaux ont établi que l'activité spontanée dans le système auditif est nécessaire à la survie des neurones, et au maintien comme à l'affinement des cartes tonotopiques cérébrales.

Récemment, l'étude de l'activité spontanée précoce des neurones auditifs primaires a connu un regain d'intérêt. Cette activité a été caractérisée par Dwight Bergles, qui s'est ensuite attaché à comprendre celle des cellules ciliées internes, qui transmettent à ces neurones l'information en rapport avec le stimulus sensoriel, c'est-à-dire l'onde acoustique. Dans une série d'articles, Bergles (Tritsch *et al.*, 2007 ; Tritsch & Bergles, 2010 ; Tritsch *et al.*, 2010) montre, chez le rat, immédiatement après la naissance, la présence de « mini-rafales » de potentiels d'action dans les neurones auditifs primaires. Elles durent de 2,5 à 3 secondes, comportent une quinzaine de potentiels d'action, surviennent à intervalles d'environ 2 minutes, et se propagent dans les voies centrales (complexe olivaire supérieur). L'activité spontanée de ces neurones diminue considérablement juste avant la mise en place de l'audition, de sorte que la réponse provoquée par le son devient totalement prépondérante. Dans la cochlée mature demeure cependant une faible activité spontanée des neurones auditifs primaires, dont le taux de décharge varie d'un neurone à l'autre parmi la vingtaine de neurones qui innervent chaque cellule ciliée interne mature. Certains ont un taux de décharge spontanée plus grand que d'autres, et une réponse provoquée dont le seuil est plus bas ; ceux dont le taux de décharge spontanée est le plus faible ont la réponse provoquée par le son dont le seuil est plus élevé. Les « mini-rafales » sont dues à la libération de glutamate par les cellules ciliées internes. Le groupe de Bergles a découvert l'existence d'une libération d'ATP par les cellules de soutien de l'organe de Kölliker, cellules voisines des cellules ciliées internes, et qui disparaissent avant l'étape finale de maturation de la cochlée. Cette libération pourrait être en rapport avec les vagues calciques qui se propagent alors dans la cochlée *via* les jonctions intercellulaires communicantes. Il a proposé un schéma d'activation des cellules ciliées internes, selon lequel les cellules de soutien libéreraient de l'ATP, qui se fixerait sur des récepteurs-canaux purinergiques P2X situés à la surface apicale de la cellule ciliée interne ; ces récepteurs P2X disparaissent quand la maturation cochléaire est achevée. La fixation de l'ATP ouvrirait ces canaux, et provoquerait une dépolarisation de la cellule ciliée interne, conduisant à l'ouverture des canaux calciques synaptiques et la libération du glutamate sur les terminaisons dendritiques des neurones auditifs primaires. Cependant, ce schéma fait débat. Walter Marcotti a présenté des résultats bien différents dans le séminaire qu'il a donné immédiatement après ce cours (Johnson *et al.*, 2011). Il confirme la libération d'ATP par les cellules de soutien, mais remet en cause son rôle dans la dépolarisation des cellules ciliées internes à l'origine de leur activité spontanée. Walter Marcotti critique les conditions expérimentales d'enregistrement des potentiels électriques des cellules ciliées internes par le groupe de Bergles. Or, c'est précisément en se fondant sur les valeurs du potentiel électrique de repos (V_m) de la cellule ciliée interne immature (qui indiquent une hyperpolarisation de cette dernière) que ce groupe a écarté les explications de l'activité spontanée de la cellule ciliée interne qui prévalaient jusqu'ici, à savoir, des potentiels d'action calciques provenant du jeu des courants calcique et potassique rectificateur retardé, la fréquence de ces potentiels étant modulée par d'autres courants, courant sodique, courant potassique activé par l'ion calcium (I_{SK2}), voire les courants calciques dus aux efférences cholinergiques de cette cellule. Walter

Marcotti confirme les valeurs du potentiel de repos de la cellule ciliée interne immature rapportées précédemment ; parce qu'elles sont supérieures à celle du potentiel d'activation des courants Ca^{2+} , il conclut qu'il n'y a plus lieu de faire intervenir une dépolarisation de la cellule ciliée interne par l'ATP pour rendre compte des potentiels d'action spontanés de ces cellules. Il découvre que la fréquence de l'activité spontanée des cellules ciliées internes présente des variations tonotopiques (fréquences de 0,6 Hz à l'apex et 1,2 Hz à la base). Il montre l'implication dans ces variations fréquentielles des efférences cholinergiques : par l'influx de Ca^{2+} qu'elles entraînent, elles inhibent l'activité des cellules ciliées internes en les hyperpolarisant *via* l'activation du courant I_{SK2} par Ca^{2+} . Tout en confirmant l'effet dépolarisant de l'ATP à forte dose, il montre que l'inhibition de la fixation de l'ATP endogène (par un inhibiteur dont la spécificité est cependant discutable), de façon inattendue, a aussi un effet dépolarisant. Il avance que l'ATP, dans cet autre rôle, agit sur un autre récepteur P2X, un récepteur situé à proximité de la synapse qui, en raison de sa colocalisation avec les canaux SK2, contrôlerait l'activité de ces derniers. Le récepteur synaptique P2X3 paraît être un bon candidat en raison de son gradient tonotopique et de sa présence transitoire. Ainsi, il attribue à l'ATP et aux efférences cholinergiques un rôle inhibiteur de l'activité spontanée des cellules ciliées internes immatures. Il suggère que cet accord en fréquence des cellules ciliées internes immatures et de leurs neurones afférents primaires sert à affiner la carte tonotopique des projections de ces derniers sur le noyau cochléaire.

Nous avons ensuite examiné les données qui éclairent la façon dont s'affinent les cartes tonotopiques au niveau du complexe olivaire supérieur. Dans l'ajustement de la réception de l'information venue de l'une et l'autre oreille sur les neurones bipolaires de l'olive supérieure médiane et latérale, l'empreinte de l'expérience auditive est attendue. Ce point a été traité au début du second cours. Nous avons d'abord présenté, en les réactualisant, les connaissances sur les deux circuits neuronaux du tronc cérébral, dont l'activité permet la localisation de la source sonore dans le plan horizontal chez les mammifères : celui de l'olive supérieure médiane, qui s'appuie sur le délai temporel de l'information qui lui parvient de l'une et l'autre oreille, et celui de l'olive supérieure latérale, qui s'appuie sur la différence d'intensité sonore reçue par l'une et l'autre oreille. Les neurones bipolaires se comportent comme des détecteurs de coïncidence de l'information provenant de chacune des deux oreilles, coïncidence temporelle pour ceux de l'olive supérieure médiane, coïncidence en intensité pour ceux de l'olive supérieure latérale. Nous avons vu que cette dichotomie avait progressivement laissé s'installer l'idée d'un traitement des basses fréquences dans l'olive supérieure médiane (les ondes de basse fréquence étant diffractées par la tête, un délai temporel est introduit entre leur arrivée à l'une et l'autre oreille quand la source s'éloigne de l'azimut 0) et des hautes fréquences dans l'olive supérieure latérale (la tête fait écran aux ondes de haute fréquence et l'intensité du son qui parvient à l'une et l'autre oreille est différente quand la source s'éloigne de l'azimut 0). Cette vision simplificatrice a récemment été remise en question (Grothe *et al.*, 2010). Quoi qu'il en soit, aussi bien pour le développement du circuit de l'olive supérieure latérale que pour celui de l'olive supérieure médiane, les données dont on dispose ne portent que sur la maturation de leurs afférences inhibitrices, constituées par les terminaisons axonales des neurones du noyau médian du corps trapézoïde, qui se projettent sur les neurones bipolaires de chacun des noyaux olivaires supérieurs, médian et latéral. Un ajustement de la carte tonotopique des afférences excitatrices est cependant attendu.

Lors d'un cours précédent, nous avons présenté des travaux indiquant que la sensibilité azimutale médiée par l'olive supérieure médiane croît après la naissance, sous l'effet de l'expérience auditive. Chez des gerbilles élevées dans des environnements bruités, où les sources sonores sont multidirectionnelles, elle n'augmente pas. Or, avant la mise en place de l'audition, les terminaisons glycinergiques des neurones du noyau médian du corps trapézoïde sont présentes à la fois sur les dendrites et le corps cellulaire des neurones bipolaires de l'olive supérieure médiane. Lors de la mise en place de l'audition, il s'opère une transition : toutes les projections glycinergiques disparaissent, à l'exception quasi-exclusive de celles qui sont présentes sur le corps cellulaire des neurones bipolaires. Cette transition dépend de l'expérience auditive ; si les sources sonores sont multidirectionnelles dans la période postnatale, cette transition n'a pas lieu.

Récemment, des avancées ont été réalisées dans la compréhension de la mise en place de la tonotopie des neurones bipolaires de l'olive supérieure latérale. Au stade mature, ces détecteurs intègrent les signaux excitateurs glutamatergiques venant du noyau cochléaire ipsilatéral et les signaux inhibiteurs de type glycinergique venant du noyau médian du corps trapézoïde, qui reçoit ses informations de l'oreille controlatérale. Les projections venant des deux côtés sont organisées de manière tonotopique, de sorte que le neurone bipolaire, en réponse à un son, est excité par les afférences venant d'un côté et inhibé par celles venant de l'autre. Durant le développement, cet alignement se met en place pour une large mesure sans expérience auditive. En effet, chez la gerbille, les courbes d'accord en fréquence des neurones inhibiteurs du noyau médian du corps trapézoïde et des neurones excitateurs du noyau cochléaire qui se projettent sur les différents neurones bipolaires indiquent qu'il existe déjà une organisation tonotopique de ces projections au moment de la mise en place de l'audition, soit au jour 13 ou 14 après la naissance. L'ajustement en fréquence gagne en précision jusqu'à l'âge adulte. Ceci met en jeu un processus en deux temps. Avant l'expérience auditive a lieu une inactivation fonctionnelle des synapses entre les neurones du noyau médian du corps trapézoïde et les neurones bipolaires de l'olive supérieure. À cette date, les extrémités axonales des neurones du noyau médian du corps trapézoïde libèrent du GABA, du glutamate et de la glycine. En utilisant du glutamate « engagé », il a été possible d'analyser la fonctionnalité de ces connexions. En 5 à 6 jours en période postnatale, chez le rat, et avant l'apparition de l'audition, 75 % des branches axonales ne sont plus fonctionnelles, ce qui correspond à un accroissement de la précision tonotopique fonctionnelle d'un facteur 2. En revanche, l'amplitude des courants dans les synapses qui restent actives est multipliée par 12. Une semaine plus tard, les extrémités axonales de ces neurones silencieux disparaissent (est associée la diminution de l'étalement des dendrites des neurones bipolaires détecteurs de coïncidence le long de l'axe tonotopique). La disparition de certaines terminaisons axonales survient après la mise en place de l'audition, et elle dépend de l'expérience auditive. L'ablation cochléaire interfère avec ce processus.

Quelle est l'explication proposée pour rendre compte de l'installation du silence fonctionnel initial ? Aux stades précoces du développement, le GABA est, non pas inhibiteur, mais excitateur, donc dépolarisant. On a avancé l'hypothèse que la dépolarisation des neurones bipolaires de l'olive supérieure latérale, suite à la libération de GABA par les neurones du noyau médian du corps trapézoïde, déclenche des potentiels d'action et active aussi les canaux calciques dépendant du voltage. Ces réponses calciques pourraient être restreintes localement et activer des

cascades de signalisation intracellulaires dépendant du calcium, qui diminueraient la force des synapses. En se fixant au récepteur NMDA des neurones bipolaires, le glutamate libéré par les neurones du noyau médian du corps trapézoïde pourrait contribuer à la plasticité synaptique. À un stade ultérieur, le GABA devenu inhibiteur pourrait exercer son rôle de dépression à long terme, qui précède l'élimination synaptique. Avec la maturation de ce circuit, les neurones du noyau médian du corps trapézoïde deviennent exclusivement glycinergiques et inhibiteurs.

Pour clore cette exploration du développement des circuits auditifs du tronc cérébral, nous avons évoqué la maturation du calice de Held, la synapse géante que forment les cellules en buisson globulaires du noyau cochléaire avec les neurones du noyau médian du corps trapézoïde. Elle se forme en l'absence de toute information électrique venant de la périphérie. Chez des animaux totalement sourds, dépourvus de libération du neurotransmetteur au niveau périphérique, le calice de Held se forme normalement. Cette conclusion, fondée sur l'étude des souris mutantes *Cav1.3^{-/-}*, appelle cependant une exploration de l'activité spontanée des neurones auditifs primaires chez ces souris.

Vocalisations néonatales innées chez la souris : production et perception

L'une des tâches essentielles du système auditif est le traitement des signaux de la communication acoustique entre membres d'une même espèce. Dans ce cadre, l'intérêt de l'étude des vocalisations périnatales est double. Il s'agit de sons naturels qui ont une valeur écologique, et ils déclenchent une réponse comportementale. Ces sons sont presque toujours complexes et souvent harmoniques (composés de multiples entiers de la fréquence fondamentale). L'étude de leur traitement dans le système auditif est un moyen d'approcher celui des sons complexes. De plus, le caractère naturel de ces sons offre des conditions expérimentales particulièrement favorables pour étudier l'intégration multisensorielle. L'intégration audio-visuelle cherchera à associer aux signaux auditifs des vocalisations les signaux visuels qui accompagnent la production de celles-ci et les mouvements de la face liés à l'articulation. Un nombre croissant de travaux montrent que la réponse à des sons naturels, et tout particulièrement aux vocalisations néonatales, met en jeu la plasticité corticale, qui peut alors être étudiée dans un contexte naturel. Enfin, les vocalisations font l'objet d'un intérêt renouvelé en raison des avancées génétiques concernant certaines maladies psychiatriques dans lesquelles il existe des anomalies de la perception de la voix : les modèles animaux présentent une perturbation des vocalisations.

Dans la seconde partie du deuxième cours, nous nous sommes intéressés aux vocalisations néonatales innées chez la souris, à leur production et à leur perception.

En 1972, Éliane Noiro (département de comportement animal, CNRS, Marseille) rapporte le fait que les rongeurs émettent des appels de détresse sous la forme d'appels ultrasoniques, l'un en réponse au froid, l'autre à une stimulation tactile inhabituelle ; le premier suscite une réponse positive de la souris située à proximité et le second, une réponse négative (Noiro, 1972). En 1982, Günter Ehret (Institute of Neurobiology, University Ulm) et Bernd Haack s'attachent à caractériser ces vocalisations chez la souris (Ehret Günter & Haack, 1982), et, en 1986, Günter Ehret décrit les vocalisations périnatales (ces souriceaux qui vocalisent sont physiologiquement sourds jusqu'à la fin de la 2^e semaine et aveugles pendant les cinq premiers jours de vie). Depuis, la description de ces vocalisations s'est

progressivement enrichie. L'étude des vocalisations chez la souris a connu deux étapes essentielles : la première a permis d'associer un comportement maternel aux vocalisations périnatales (Ehret G & Bernecker, 1986), la seconde a établi un parallèle entre la structure des vocalisations émises par un mâle lors de la rencontre avec une femelle et la structure syllabique des langues (Holy & Guo, 2005).

Un comportement maternel est observé en réponse à deux types de vocalisations périnatales : l'un dit appel « frétilant », audible, de structure harmonique et d'intensité d'environ 70 décibels en milieu naturel, est émis par les nouveau-nés qui se battent pour l'accès aux mamelles maternelles, durant les cinq jours qui suivent la naissance. Les souriceaux n'émettent ces vocalisations que lorsque la mère est en position d'allaitement. L'autre est un cri ultrasonore, émis par les souriceaux que l'on éloigne de leur mère. Ces deux types de vocalisations périnatales cessent avec la disparition de leurs facteurs déclenchants, c'est-à-dire quand les souriceaux deviennent autonomes par rapport à la source de nourriture.

En 1986, Günter Ehret et ses collègues ont décrit le comportement de la mère en réponse à « l'appel frétilant ». Les mères lèchent leurs petits, ce qui les stimule, et changent de position pour leur faciliter l'accès aux mamelles. En altérant l'audition des mères, en utilisant des nouveau-nés anesthésiés et en présentant ces vocalisations en *playback*, l'origine auditive des stimulations comportementales a été établie. Puis, pour définir les paramètres acoustiques dont la perception est à l'origine du comportement maternel, la composition de ces vocalisations a été modifiée ; l'objectif étant de découvrir quels sont les paramètres essentiels au regroupement perceptif des fréquences en un même objet acoustique stimulant. Tantôt, les fréquences elles-mêmes (3,8 kHz, 7,6 kHz et 11,4 kHz) étaient modifiées (léger changement d'une des fréquences, maintien de la structure harmonique de l'appel mais présentation de fréquences appartenant ou non à une même bande critique, usage de fréquences plus élevées mais dont la fréquence fondamentale est ou non la même que celle des vocalisations, présence ou absence d'une modulation en amplitude), tantôt leur présentation était décalée dans le temps, tantôt leur durée de présentation variait collectivement ou isolément. Le choix des paramètres testés était dicté par la compréhension que l'on a de la reconnaissance par les jeunes enfants des voyelles, dont la structure est aussi harmonique, et des syllabes. Les auteurs ont conclu à l'importance de la structure harmonique, de l'extraction de la fréquence fondamentale manquante, de la distribution des harmoniques dans différentes bandes critiques, de la modulation en amplitude, d'un temps de présentation des fréquences permettant leur fusion perceptive, pour déclencher le comportement maternel. Or, ces mêmes éléments sont critiques chez l'homme pour la perception des voyelles. En d'autres termes, le traitement des sons harmoniques chez la souris paraît voisin de ce qu'il est chez l'homme, ce qui permet de supposer qu'il était déjà présent il y a 200 millions d'années.

Très peu de travaux ont été consacrés à l'analyse des circuits neuronaux impliqués dans la reconnaissance des vocalisations périnatales ; jusqu'ici, les études ont porté essentiellement sur la comparaison des enregistrements électrophysiologiques intracellulaires de neurones corticaux, obtenus chez les mères et les femelles vierges anesthésiées. Ces études ont ensuite été élargies à des souris éveillées. Un travail publié en 2009 par Edgar Galindo-Leon donne les premiers éléments de compréhension de la plasticité cérébrale auditive qui conduit à la mise en place du comportement maternel (Galindo-Leon *et al.*, 2009). La réponse aux vocalisations ultrasonores périnatales chez les mères et les femelles vierges éveillées est analysée

par enregistrement des réponses neuronales excitatrices et inhibitrices au sein du cortex auditif, sous forme de potentiels de champ local (potentiels extracellulaires produits par l'activité synchrone d'un ensemble de neurones, sur une distance d'environ 300 micromètres) et de réponses neuronales unitaires. Sur les enregistrements unitaires, les neurones dont l'activité est stimulée par les vocalisations ne montrent aucune différence de leurs réponses (latence, amplitude, taux de décharge) chez des mères et chez des femelles vierges. En revanche, les neurones dont l'activité est inhibée par les vocalisations montrent une latence de réponse plus courte, une réponse plus soutenue dans le temps, et un taux de décharge dont la décroissance par rapport à leur activité spontanée est plus importante chez les mères que chez les femelles vierges. Les ondes sont aussi mieux définies chez les mères, indiquant une meilleure synchronie de la baisse d'activité des neurones. Quelles sont les populations neuronales dont les réponses inhibitrices sont ainsi modulables ? Les réponses de potentiel de champ local ont été mesurées dans des régions du cortex auditif accordées en fréquence avec les vocalisations (50 kHz), ou avec des fréquences d'accord un peu plus hautes ou un peu plus basses. Les données obtenues montrent une modification de la précision de la phase de la réponse inhibitrice exclusivement dans des régions accordées à des fréquences un peu plus basses que celles des vocalisations. Les auteurs suggèrent que l'accroissement de l'inhibition d'activité des neurones accordés à une fréquence proche mais plus basse que celles des vocalisations permettrait d'accroître la perception des vocalisations en inhibant la réponse à des bruits surajoutés de fréquence proche. Cette plasticité corticale portant sur les réponses inhibitrices aux vocalisations périnatales est sans doute sous contrôle hormonal.

Après cet examen de l'ouverture de la plasticité du cortex auditif observée chez les souris adultes dans le cadre des modifications hormonales de la mise bas que nous venons de voir, le 3^e cours a porté sur la plasticité développementale du cortex auditif. Cette plasticité explique les bons résultats de l'implantation cochléaire chez l'enfant atteint de surdité congénitale profonde ; elle en conditionne le succès. Elle permet « d'éveiller » un cortex qui n'a encore reçu aucune information sensorielle. Elle permet le développement d'une perception de signaux acoustiques qui, bien qu'ils ne comportent que certaines caractéristiques acoustiques des sons de parole, permettront l'élaboration du langage. En retour, l'implantation cochléaire éclaire la compréhension de la plasticité développementale du cortex auditif, chez l'homme comme chez l'animal.

L'implant cochléaire est un transducteur acoustico-électrique, comme la cochlée. Un microphone transforme les signaux acoustiques en signaux électriques. Un microprocesseur vocal analyse les signaux électriques de sortie du microphone. Les signaux traités sont délivrés à des électrodes implantées dans la cochlée, qui stimulent les neurones auditifs primaires par la création d'un champ électrique à proximité.

La période durant laquelle les stimulations acoustiques peuvent modeler le développement du système auditif, et tout particulièrement du cortex auditif, est appelée période critique (ou sensible) ; elle se referme progressivement avec l'âge. Robert Shannon, un chercheur du Hearing Institute de Los Angeles, a présenté, durant le séminaire associé au cours, les progrès de l'implantation du système auditif. Elle n'est plus restreinte à la cochlée ; des implantations du noyau cochléaire et du colliculus inférieur ont déjà été réalisées chez l'homme, avec des résultats variables pour les premiers, et sans succès pour les seconds.

Le cours a été introduit par une présentation de l'organisation anatomo-fonctionnelle du cortex auditif. L'organisation des aires du cortex auditif est très différente d'un mammifère à l'autre, y compris dans le cortex primaire. Le cortex auditif des primates a été présenté. Il se situe dans le gyrus temporal supérieur, et comporte trois régions : une région centrale (en anglais, *core*), une ceinture (*belt*) et une paraceinture (*parabelt*). La paraceinture est superficielle ; elle recouvre les deux autres régions.

La région centrale est composée des trois aires auditives primaires, d'arrière en avant, l'aire ou champ A1, le champ rostral (R) et le champ rostro-temporal (RT). Chacune de ces trois aires reçoit des projections directes du noyau ventral du corps genouillé médian du thalamus. Les analyses électrophysiologiques ont permis d'établir l'existence d'une organisation tonotopique de ces trois aires, dont le caractère plus ou moins strict reste à définir, ainsi que leur organisation relative. Les régions pour l'analyse des basses fréquences des champs AI et R, et les régions pour celle des hautes fréquences entre les champs R et RT, sont juxtaposées. La ceinture est faite de 8 sous-régions qui se distribuent autour des trois champs de la région centrale. Elles ont aussi une organisation tonotopique qui coïncide avec celle des aires primaires. Elle est en miroir pour deux sous-régions juxtaposées.

Les trois aires primaires fonctionnent en parallèle pour traiter les informations venant du thalamus. Les régions voisines des aires primaires sont cependant interconnectées, d'où le fait que leurs atteintes peuvent être conjointes. Les neurones des aires primaires se projettent sur ceux de la ceinture, en un réseau de fibres parallèles.

L'organisation tonotopique s'efface au niveau de la paraceinture. Située en bordure de la partie latérale de la ceinture, elle est divisée en une région caudale et une région rostrale. Ses neurones sont connectés à ceux de la ceinture. Les neurones des aires de la paraceinture se projettent sur le sillon temporal supérieur (STS) des aires temporo-pariéto-occipitales. Les autres connexions sont organisées en deux voies majeures : l'une antérieure (ou rostrale) et l'autre postérieure (ou caudale), mises en évidence depuis une dizaine d'années. La voie antérieure unit les parties antérieures de la ceinture et de la paraceinture à la partie antérieure du cortex préfrontal, et la voie postérieure les parties postérieures de la ceinture et de la paraceinture à la partie postérieure du cortex préfrontal, d'où un traitement d'informations auditives distinctes dans chacune d'elles. Dans le système visuel, deux voies de ce type existent, respectivement dédiées au traitement de l'information spatiale et non-spatiale. Dans le cortex auditif, les expériences d'électrophysiologie ont permis d'établir des conclusions semblables : la voie antérieure est dédiée à la reconnaissance de l'objet acoustique, et la voie postérieure à la localisation de la source sonore. Enfin, la région caudale de la ceinture dite « médiane » (CM) est connectée à des aires somatosensorielles (dans le cortex rétro-insulaire et l'insula granulaire) ainsi qu'à des aires multisensorielles temporo-pariétales.

La structuration en couches du cortex auditif, de la superficie à la profondeur, est semblable à celle des autres régions du cortex. Les six couches parallèles à la surface (numérotées de 1 à 6, de la superficie à la profondeur) sont traversées d'une organisation verticale en modules ou colonnes corticales cylindriques, dont le diamètre est de 200 à 300 micromètres, et qui correspondent à des unités fonctionnelles de traitement de l'information. Chacune de ces unités comporte environ 5 000 neurones. Ils reçoivent plusieurs types de projections, dont les signaux thalamiques qui leur parviennent au niveau de la couche 4. Ces unités sont

peuplées de neurones, dits « cellules pyramidales », qui s'étendent sur toute la hauteur des colonnes : leur corps cellulaire est situé dans la couche 3, et leurs extrémités se projettent sur la couche 1 et la couche 6.

La plasticité du système auditif, clé d'une restauration de la fonction auditive chez les malentendants

Après avoir discuté, dans le cours précédent, la phase d'auto-organisation du système auditif, puis le rôle de l'activité électrique sur la formation des premiers relais auditifs, nous nous sommes intéressés à la plasticité des aires corticales auditives chez l'animal durant la phase de maturation corticale. Nous l'avons approchée par l'étude des effets de l'implantation cochléaire chez des chats sourds, et des effets produits par une exposition de longue durée à un bruit (son de large bande passante) pulsé, chez des rongeurs. Le choix du chat comme modèle expérimental est motivé par la possibilité de réaliser des implantations cochléaires chez cet animal, et par l'existence de lignées mutantes de chats sourds profonds par atteinte de la strie vasculaire cochléaire. Chez ces chats mutants, aucune activité électrique n'est enregistrée en réponse à une stimulation acoustique en raison de l'absence du potentiel électrique endocochléaire. Les neurones auditifs primaires sont cependant préservés, d'où l'efficacité de leur stimulation par l'implant cochléaire. De plus, les facultés d'apprentissage sont bien développées chez le chat, ce qui permet le recours à des tests comportementaux. Chez le chat, la période de maturation du système auditif s'étend jusqu'au 8^e mois.

En 1999, Rainer Klinke et ses collaborateurs (Klinke *et al.*, 1999) ont cherché à comprendre l'origine de l'échec de la restauration de l'audition par l'implantation cochléaire chez les individus adultes atteints de surdité profonde prélinguale, alors que l'implantation pratiquée dans l'enfance est un succès. L'effet d'une stimulation chronique *via* un implant cochléaire unilatéral posé au 3^e ou 4^e mois de vie chez les chats sourds, a été étudié. Par un test comportemental dans lequel la réponse perceptive à un son de 437 Hz est récompensée par l'accès à la nourriture, un taux maximal de réponses, avoisinant 100 %, est obtenu en huit jours chez les chats témoins, non mutants ; chez les chats sourds appareillés, ce taux est atteint plus progressivement, quelques jours plus tard, et dans les cas les plus défavorables, environ 20 jours plus tard. Ceci suggère que la représentation du signal acoustique après implantation passe par un processus de maturation du cortex auditif.

Ce processus de maturation a été étudié par l'examen des potentiels de champs locaux superficiels et profonds, et des réponses électriques des neurones individuels (enregistrements intracellulaires uni-ou multi-électrodes) induites par un son test, grâce à des électrodes implantées de façon permanente dans le cortex auditif controlatéral à l'implant cochléaire. Les réponses enregistrées, après un mois, deux mois, et cinq mois et demi de stimulation chronique *via* l'implant cochléaire mettent en évidence le développement progressif de réponses corticales. Les enregistrements des potentiels de champs locaux montrent que les ondes de latence moyenne, survenant moins de 30 millisecondes après la stimulation sonore, augmentent en amplitude. Le changement le plus net porte sur les réponses plus tardives ; absentes chez les chats sourds implantés mais qui n'ont pas été soumis à une stimulation chronique, elles apparaissent après une stimulation continue *via* l'implant cochléaire. Elles sont la marque d'une maturation de circuits corticaux. Les enregistrements intracellulaires

confirment ces résultats : l'amplitude de la réponse de latence moyenne est multipliée par environ 2,4 par rapport à celle observée chez des chats mutants implantés mais non stimulés de façon chronique, et une onde tardive (150 millisecondes après la stimulation) apparaît aussi. Les enregistrements unitaires montrent que les réponses de latence moyenne et longue sont obtenues dans les mêmes neurones.

La taille des champs corticaux mesurés aussi par l'amplitude des potentiels de champs locaux augmente considérablement sous l'effet de la stimulation chronique. Les aires corticales qui répondent ont une surface multipliée par 7 au moins. Elles sont plus étendues que chez les chats normaux. L'étude des réponses dans les différentes couches du cortex montre aussi un effet de la stimulation chronique. Sans stimulation chronique, la réponse de latence comprise entre 10 et 30 millisecondes chez le chat implanté se situe principalement dans la couche 4 et, de façon marginale, dans les couches 2 et 3. Après stimulation chronique, des réponses de même latence sont présentes dans toutes les couches corticales (elles débutent dans les couches 4, 5, 2 et 3, puis s'étendent aux autres couches). La chronologie des diverses modifications corticales induites par la stimulation chronique est la suivante : l'augmentation d'amplitude des ondes de latence moyenne apparaît en quelques jours de stimulation chronique, une réponse tardive en moins d'un mois, et de larges aires de réponse corticale apparaissent vers 2 mois. La stimulation du système auditif *via* l'implant cochléaire provoque donc une structuration fonctionnelle progressive du cortex auditif.

L'effet de l'exposition au bruit pendant la période critique a été étudié par le groupe de Michael Merzenich (Zhang *et al.*, 2002 ; Chang & Merzenich, 2003) chez le rat. Durant cette période, qui s'étend de P12 à P28, les rats sont continuellement soumis à un bruit blanc (0,5 à 30 kHz) de 60 à 70 dB, au rythme de six impulsions par seconde, suivies d'une seconde de silence. Puis ils sont soustraits à l'exposition au bruit pulsé et replacés dans un environnement sonore habituel. L'effet de l'exposition au bruit est évalué au jour 80, soit un peu moins de deux mois après la fin de la stimulation. Les réponses électrophysiologiques à deux sons tests, de 8 kHz et 16 kHz, sont explorées avec les mêmes analyses que celles décrites plus haut. Les potentiels de champs locaux sont mis à profit pour établir l'équivalent de « courbes d'accord en fréquence » (qui permettent de tracer les cartes tonotopiques de réponse corticale). L'exposition au bruit engendre une dégradation de l'accord en fréquence des régions corticales répondant à chacune de ces deux fréquences. Une étude plus approfondie du processus de maturation du cortex a été entreprise. Les expériences faites chez des rats témoins ont défini que la tonotopie corticale se développe à partir de deux processus développementaux parallèles, qui impliquent deux zones corticales différentes : la zone postérieure (correspondant à la région A1 chez l'adulte), qui est mature au jour postnatal 22 (P22), et une région antérieure, dévolue à la réponse aux sons de haute fréquence, dont la maturation se prolonge plus tard. Chez les rats soumis au bruit, entre les jours P15 et P19, le cortex auditif paraît être plus différencié que chez les rats témoins. Ils présentent des réponses à des fréquences plus diverses, sans pour autant qu'elles évoquent une organisation tonotopique. Au jour 23, les neurones qui répondent à une même fréquence sont encore dispersés dans le cortex, et chez le jeune adulte, au jour 80, on observe deux régions : l'une qui comporte des neurones accordés à des fréquences basses ou moyennes avec des discontinuités dans le champ récepteur, et l'autre qui comporte des neurones qui répondent préférentiellement à des fréquences élevées, mais dont la réponse est très peu

accordée en fréquence. L'établissement de la tonotopie corticale est donc très affecté par l'exposition à un bruit pulsé pendant la période critique.

Chez les rats témoins, les neurones proches dans le cortex déchargent de façon synchrone ; les neurones éloignés ont des décharges plus asynchrones. Chez les rats exposés au bruit, les réponses sont paradoxalement moins synchrones dans les zones accordées en fréquence, et le sont davantage dans celles qui ne le sont pas. Au total, sur l'ensemble des paramètres testés ici, le développement du cortex est profondément perturbé par l'exposition au bruit pulsé. Afin de se rapprocher de conditions d'exposition au bruit plus physiologiques, un bruit continu de 70 dB a été surajouté à l'exposition sonore naturelle de rats, durant la phase critique (l'exposition débute au jour 9 et se poursuit jusqu'à la veille du test). Dans ces nouvelles conditions expérimentales, des anomalies des cartes tonotopiques sont aussi observées, mais, au jour 50, une organisation du cortex semblable à celles des rats témoins âgés de 16 jours est présente. En d'autres termes, le bruit surajouté a essentiellement freiné la maturation du cortex. Quant à la période de plasticité, l'étude montre qu'elle a en fait été prolongée. Si l'exposition au bruit est levée, la maturation corticale reprend. On ne sait pas si les effets du bruit sur la maturation du cortex humain sont semblables.

Chez l'homme, la plasticité du cortex auditif a été principalement approchée par les études faites dans le cadre de l'implantation cochléaire. En 2001, une étude démontrait l'existence d'un parallélisme entre la présence d'aires corticales auditives présentant un hypométabolisme (analyse en tomographie par émission de positons, PET) chez de jeunes enfants sourds profonds et le succès de l'implantation cochléaire. Or, plus les enfants avancent en âge, plus ces régions d'hypométabolisme s'amenuisent ; elles sont progressivement réaffectées à une autre fonction sensorielle, le traitement de l'information visuelle, et deviennent alors métaboliquement actives.

Dans un travail récent, Andrej Kral et ses collaborateurs (Lomber *et al.*, 2010) se sont intéressés à ce détournement fonctionnel d'aires corticales dédiées à un sens au profit d'un autre. Ce phénomène est très général ; les aires visuelles chez les aveugles de naissance répondent ultérieurement aux signaux acoustiques. Dans un premier temps, les auteurs ont évalué chez l'animal (le chat), la notion communément admise chez l'homme, selon laquelle les personnes sourdes présenteraient des performances visuelles supra-normales. Ils ont montré que chez les chats sourds profonds susmentionnés, certaines performances visuelles, la localisation de la source lumineuse et la détection de son mouvement, sont, de fait, meilleures que chez les chats entendants. En revanche, pour d'autres performances visuelles, telles que l'acuité visuelle, la discrimination de l'orientation, la détection de la direction du mouvement et de la vitesse, leurs performances ne sont pas meilleures. Puis ils se sont interrogés sur la nature des aires auditives recrutées dans ces fonctions visuelles. Pour tester les différentes zones du cortex auditif qui pourraient être impliquées dans la localisation de la source lumineuse et son mouvement, une technique d'inhibition fonctionnelle réversible par refroidissement d'une zone corticale restreinte a été utilisée. Ainsi, ces auteurs ont observé que le refroidissement du cortex auditif primaire n'a aucun effet. Le champ auditif postérieur a en revanche été reconnu comme impliqué dans la localisation de la source lumineuse, et le champ dorsal dans la détection de son mouvement. La réaffectation de ces aires auditives ne semble pas être quelconque puisque le champ auditif postérieur réaffecté à la localisation de la source lumineuse est normalement impliqué dans la localisation de la source sonore. Quant à l'aire dorsale recrutée dans la détection du

mouvement de la source lumineuse, elle est adjacente à l'aire qui détecte les mouvements visuels chez les personnes entendant. Il semble à l'inverse que les aires sensorielles dédiées à une modalité sensorielle élémentaire, comme déceler la couleur ou la hauteur sonore, ne changent pas d'affectation lorsqu'elles sont privées de leurs signaux sensoriels naturels. En revanche, les aires corticales qui remplissent des fonctions « supra-modales », privées de leur information sensorielle naturelle, pourraient traiter les nouveaux signaux sensoriels qui leur parviennent en leur appliquant un mode d'analyse semblable à celui qu'elles auraient appliqué normalement à leur stimulus d'origine.

L'implantation cochléaire chez le chat a aussi été mise à profit pour étudier la plasticité du noyau cochléaire, mais cette fois à l'échelle cellulaire. Rappelons que les extrémités axonales des neurones auditifs forment des synapses de grande taille, terminaisons bulbaires de Held, avec les cellules globulaires en buisson du noyau cochléaire. De plus, l'axone des neurones auditifs s'arborise de façon répétée, et ses extrémités vont englober les cellules globulaires en un ensemble de renflements et de boutons terminaux. Chez les chats atteints de surdité congénitale, le nombre des branches des neurones auditifs est réduit, de même que celui des terminaisons bulbaires. Les vésicules synaptiques qu'elles contiennent sont en nombre moindre et les densités postsynaptiques sont aussi modifiées. Sous l'effet de l'implantation cochléaire, la morphologie synaptique est rétablie.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes qui sous-tendent la plasticité développementale du système auditif au niveau cortical. Nous avons vu successivement l'effet de la privation auditive sur l'acquisition de la potentialisation à long terme au niveau du cortex auditif primaire, et la maturation des projections thalamo-corticales dans le système auditif. Un travail du groupe de Dan Sanes (Kotak *et al.*, 2007) a montré que la période de plasticité corticale se caractérise par un changement de l'équilibre entre les synapses qui sont le siège d'une dépression à long terme et celles qui sont le siège d'une potentialisation à long terme. La dépression à long terme domine avant la mise en place de l'audition. Après la mise en place de l'audition, les synapses présentant une dépression à long terme et celles présentant une potentialisation à long terme sont en nombre équivalent. Chez les gerbilles sourdes profondes par ablation cochléaire avant la mise en place de l'audition, il n'y a pas de développement de la potentialisation à long terme dans les synapses du cortex auditif primaire.

À la fin du 3^e cours et au début du 4^e, la présentation d'un travail du groupe de Takao Hensch sur la maturation et la plasticité des connexions entre les neurones du noyau ventral du corps genouillé médian du thalamus et ceux du cortex auditif primaire (synapses thalamo-corticales), qui venait d'être publié (Barkat *et al.*, 2011), a complété cet aperçu des avancées récentes sur les mécanismes de la plasticité corticale dans le système auditif. Les auteurs concluaient que la maturation des synapses entre les projections axonales thalamiques et les épines dendritiques des cellules pyramidales est très probablement le substrat de la plasticité développementale du cortex auditif primaire. Elle est concomitante de l'établissement des cartes tonotopiques corticales, qui se manifestent par l'homogénéisation des taux de décharge des neurones corticaux et le changement de localisation de ces synapses, qui se déplacent de la profondeur du cortex à sa superficie.

Chez l'homme, la période critique pour l'audition, c'est-à-dire celle durant laquelle la stimulation acoustique se traduit par une réorganisation du système auditif, sans doute dans chacun de ses relais, du tronc cérébral jusqu'au cortex

auditif primaire au moins, s'étend jusqu'à environ 3 ans et demi, puis la plasticité baisse progressivement. En conséquence, toute démarche thérapeutique qui vise à restaurer l'audition chez des enfants sourds profonds de naissance par atteinte cochléaire, soit par l'implantation cochléaire, soit, dans le futur, par des approches nouvelles (transdifférenciation, thérapies cellulaires et géniques), doit être adaptée dans sa date de mise en œuvre à la contrainte temporelle de la période critique. Le degré de plasticité sollicité par les diverses approches thérapeutiques pourrait cependant être plus ou moins important selon la divergence existant entre les signaux transmis par les neurones auditifs après traitement et ceux qu'ils véhiculent normalement. Le défi que pose la restauration de l'audition, à un âge plus avancé, chez les personnes atteintes de surdité profonde dès la naissance, est celui de la « réouverture » de cette plasticité.

Épilepsies déclenchées par le son et épilepsies à composante auditive : bases génétiques et modèles animaux

L'autre partie du dernier cours a porté sur les épilepsies en rapport avec l'audition : les épilepsies déclenchées par le son qui appartiennent à la classe des « épilepsies réflexes », plutôt appelées « crises paroxystiques », et les épilepsies généralisées qui incluent des perceptions auditives particulières ou des hallucinations auditives (épilepsies du lobe temporal).

Ces épilepsies ont trouvé leur place dans cette série de cours consacrée au développement du système auditif parce que la phase durant laquelle s'élabore le processus biologique qui conduira aux manifestations cliniques se situe durant le développement du système auditif. L'objectif de cette présentation était d'apprécier comment l'étude de ces épilepsies peut contribuer à la compréhension du développement du système auditif et de ses mécanismes moléculaires. Les épilepsies héréditaires dont le ou les gènes impliqués ont été identifiés sont, sur ce point, les plus informatives, puisque que l'on peut en élaborer des modèles murins.

Le cours a été introduit par un bref rappel sur la fréquence des épilepsies, les causes en particulier génétiques (80 % de concordance chez les jumeaux monozygotes, pour les épilepsies généralisées), et les données électroencéphalographiques (qui traduisent la décharge synchrone de populations de neurones). Nous nous sommes ensuite intéressés aux épilepsies réflexes ou crises paroxystiques.

Elles peuvent être déclenchées par des stimulations plus ou moins complexes : une lumière intense, le fait de regarder la télévision, de fixer du regard un objet ou une personne, ou des stimuli sensoriels autres, somatosensoriels, auditifs, gustatifs, olfactifs, thermiques (épilepsie déclenchée par l'eau chaude par exemple), ou liés à l'équilibration. Certaines « épilepsies » réflexes sont déclenchées par des stimulations plus complexes (par exemple le fait de lire, de se précipiter pour manger, de se brosser les dents...). Dans cette catégorie, se rangent les épilepsies déclenchées par la musique. Elles sont connues depuis longtemps : Shakespeare les mentionne dans *Le marchand de Venise* à la fin du XVI^e siècle. La musique provoquerait des crises d'épilepsie chez seulement une personne sur 10 millions. Les caractéristiques des sons musicaux qui déclenchent des épilepsies semblent être généralement des mélodies qui comportent une structure harmonique. Certaines personnes présentent des crises épileptiques spécifiquement déclenchées par un instrument de musique particulier, le piano par exemple. Si la séquence sonore qui

déclenche la crise est complexe dans sa structure acoustique, l'origine de l'épilepsie se situe soit au niveau cortical, soit au niveau sous-cortical du système auditif. Pour celles qui sont déclenchées par des sons peu complexes, l'origine peut en théorie se situer à n'importe quel niveau du système auditif.

Contrairement à l'homme, les animaux ont une susceptibilité particulière aux épilepsies réflexes déclenchées par le son, dites « audiogènes », et appelées plus précisément crises paroxystiques audiogènes. Cette notion a été établie au début du XX^e siècle. Elle repose sur les observations faites dans le laboratoire d'Ivan Pavlov. Dans le déroulement des expériences de conditionnement des animaux à la prise alimentaire (des chiens bien souvent), la présentation imminente de la nourriture annoncée par un stimulus sonore, le tintement d'une cloche, déclenchait souvent des crises d'épilepsies. Les épilepsies audiogènes ont ensuite été observées chez les rongeurs : diverses lignées de rats et de souris de laboratoire. S'agissant de lignées pures, il devenait possible d'en identifier les bases génétiques.

En 1947, Calvin S. Hall observait que la lignée de souris DBA/2 (D2) présente une susceptibilité génétique aux crises épileptiques audiogènes (Hall, 1947). Sous l'effet du son, ces souris démarrent soudainement une course erratique, dite « course folle », qui dure quelques secondes (de 1 à 12 s) et est suivie de crises tonico-cloniques. La souris ne peut pas rester sur ses pattes. Puis ses pattes se mettent en flexion suivie d'une phase d'extension. Un arrêt respiratoire se produit si on maintient la stimulation sonore. Chez ces souris, les crises apparaissent à la 3^e semaine de vie, puis vont disparaître progressivement. Des crises semblables ont ensuite été décrites dans d'autres lignées de souris : les lignées Black Swiss (BLSW), les lignées BuB/BnJ et Frings. Des lignées de rats présentant des crises audiogènes ont aussi été rapportées, puis les rats Wistar, sélectionnés dans un laboratoire strasbourgeois par Marescaux en 1987 (Marescaux *et al.*, 1987), les rats GEPR (*genetically epileptic-prone rats*), dont ont été dérivées deux sous-lignées, GEPR-9 dont l'épilepsie est très sévère et GEPR-3 dans laquelle elle l'est moins, puis une autre souche, dite WAR, a été dérivée des rats Wistar. Dans tous les cas, l'épilepsie est d'apparition précoce (3^e semaine), soit quelques jours après l'apparition de l'audition.

L'analyse génétique a révélé, dans chacune de ces lignées de rats et de souris, plusieurs loci contribuant à des degrés divers au phénotype, à l'exception de la lignée Frings, dans laquelle un seul gène est en cause. Aujourd'hui, quelques gènes de susceptibilité, c'est-à-dire des gènes dont les mutations se manifestent par une sensibilité accrue au développement de crises audiogènes, ont été identifiés.

Ces gènes codent pour :

- le récepteur à la sérotonine (5-HT, neurotransmetteur), de sous-type 2C. Il s'agit d'un récepteur couplé aux protéines G. Contrairement aux autres modèles murins, les crises audiogènes chez le mutant murin dont le gène correspondant a été inactivé apparaissent après 2 mois ;
- la protéine transmembranaire *Vlgr1* (*Very large G protein-coupled receptor*) (gène *Vlgr1/Mass1/USH2C*), défectueuse chez les souris Frings et BuB/BnJ ;
- la protéine codée par le gène *FMRI*, défectueuse dans le syndrome du chromosome X fragile ;
- la protéine *Gipc3*, protéine intracellulaire qui possède un domaine PDZ situé en position centrale. Elle est codée par le gène dont la contribution au phénotype épileptique des souris Black Swiss (BLSW) est majeure. Le rôle de *Gipc3* pourrait être lié au trafic vésiculaire synaptique.

Demeure une inconnue supplémentaire pour les gènes *GIPC3* et *VLGR1* : les patients porteurs de mutations dans ces gènes, comme les souris dont l'un ou l'autre gène est inactivé, ont une surdité d'origine cochléaire. De ce fait, bien que ces deux gènes soient aussi exprimés dans le système nerveux central, on est amené à s'interroger sur la possibilité que ces épilepsies aient une origine en rapport avec l'anomalie du système auditif périphérique.

Enfin, à l'inverse, il a été rapporté que l'inactivation du gène qui code la contactine 5, protège contre les crises audiogènes. Les contactines sont des molécules d'adhésion dont la structure commune est caractérisée par la présence de 6 domaines de type Ig, 4 répétitions de type III de la fibronectine, et une « ancre » glycosylphosphatidylinositol (GPI). Elles ont un rôle critique durant le développement du système nerveux, et également au stade mature.

Faire la part entre l'atteinte de la cochlée et celle éventuelle d'autres neurones du système auditif chez les souris déficientes en *Gipc3* ou en *Vlgr1* appelle des études approfondies des souris mutantes, qui n'ont pas encore été réalisées. On dispose cependant de certaines informations concernant les souris déficientes en *Gipc3* (Charizopoulou *et al.*, 2011). Elles indiquent qu'il n'y a pas de corrélation entre l'évolution du seuil auditif et la présence des crises audiogènes. Le seuil auditif reste stable chez ces mutants et les convulsions audiogènes s'effacent. En revanche, une augmentation de l'amplitude de l'onde I des potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral est corrélée avec les crises épileptiques. Cette onde I traduit l'activité synchrone des neurones auditifs. La possibilité d'une libération massive de glutamate par les cellules ciliées internes, qui synchroniserait l'activité des neurones auditifs (d'où l'augmentation d'amplitude de l'onde I), est évoquée. À l'appui de cette idée, chez ces souris mutantes, certains courants potassiques de la cellule ciliée interne sont défectueux. Il s'ensuivrait une dépolarisation plus ample de la cellule ciliée interne stimulée par le son, ce qui pourrait accroître la libération du glutamate. L'inactivation conditionnelle du gène *Gipc3* restreinte aux seules cellules sensorielles permettrait de tester cette proposition. Pour *Vlgr1*, la situation est assez comparable. On sait que la protéine est exprimée dans le cerveau à une étape précoce du développement. De surcroît, *Vlgr1* partage un grand domaine d'homologie avec une classe de protéines impliquées dans des épilepsies généralisées.

Cette discussion sur l'origine peut-être périphérique de l'épilepsie due au déficit en *Vlgr1* ou *Gipc3* ne doit pas masquer le fait que toutes les autres épilepsies ou crises audiogènes susmentionnées chez le rat et la souris paraissent avoir une origine centrale. Les profils d'expression de c-Fos (facteur de transcription nucléaire le plus fréquemment synthétisé suite à un signal activateur) après une stimulation sonore chez ces autres mutants ont fait apparaître une hyperactivité dans les noyaux auditifs centraux chez les souris mutantes défectueuses pour le récepteur de la sérotonine (exprimé dans les régions dorsales et externes du colliculus inférieur, le corps genouillé médian du thalamus, le noyau thalamique postérieur dans sa région intralaminaire), ou pour *Fmr1* (exprimé dans le lemnisque latéral dorsal, la région corticale dorsale du colliculus inférieur). Chez les souris mutantes pour la contactine 5, on observe au contraire une baisse de l'activité c-fos (dans le noyau cochléaire antéro-ventral, le complexe de l'olive supérieure, le lemnisque latéral et le colliculus inférieur). Des données préliminaires indiquent qu'en l'absence de la contactine 5, le développement du colliculus inférieur est affecté. Toutefois, compte tenu de la présence de la contactine 5 dans d'autres centres auditifs, une étude systématique explorant de possibles altérations dans des relais en amont est nécessaire.

En conclusion, ces épilepsies déclenchées par le son chez l'animal constituent une voie d'entrée dans la physiologie moléculaire du système, et le plus souvent du système auditif central, qui fait défaut aujourd'hui. Enfin, il faut souligner la parenté éventuelle entre ces crises audiogènes et l'hyperacousie. L'hyperacousie désigne le fait de souffrir de l'exposition à des sons dont l'intensité est en règle générale bien tolérée. Un nombre important de personnes se plaignent d'entendre trop fortement des sons d'intensité bien tolérée par les autres. L'hyperacousie est aussi présente dans certaines maladies neuropsychiatriques comme l'autisme. Des éléments de réponse concernant la pathogénie de l'hyperacousie pourraient venir des travaux menés sur les épilepsies audiogènes chez l'animal.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux épilepsies du lobe temporal latéral parce qu'elles comportent des manifestations auditives. Leur déclenchement n'est pas lié à une stimulation sonore. Patrick Chauvel (université de la Méditerranée, faculté de médecine, Marseille), spécialiste de l'épilepsie, a complété cette partie du cours lors du séminaire. Le cours s'est concentré sur une forme héréditaire d'épilepsie temporale, la forme liée au déficit en Lgi1.

En 2002, un des membres de la famille protéique Lgi (pour *Leucine-rich glioma inactivated*) a été identifié comme responsable d'une forme d'épilepsie du lobe temporal transmise sur le mode autosomique dominant (Kalachikov *et al.*, 2002). La protéine Lgi1 avait été initialement classée comme suppresseur de tumeur. La pénétrance de la mutation faux-sens découverte dans une famille atteinte d'épilepsie temporale n'était que partielle (environ 67 %). La famille Lgi comporte 4 membres (Lgi1 à Lgi4). Elle constitue elle-même une sous-classe d'une famille de protéines qui comprend 3 autres membres, dont le regroupement est fondé sur la présence de 7 répétitions consécutives dites « EAR » (*Epilepsy Associated Repeats*). Ces protéines sont prédites comme étant sécrétées. Un second membre de la famille Lgi, Lgi2, a été reconnu comme responsable d'épilepsie juvénile bénigne chez le chien, dans la lignée *Lagotto Romagnolo* : l'épilepsie survient entre 5 et 9 semaines après la naissance, et elle disparaît systématiquement à l'âge de 4 mois. Les animaux ont des tremblements de l'ensemble du corps avec des pertes de conscience et l'on observe à l'électroencéphalogramme des décharges épileptiques unilatérales situées dans les lobes occipitaux et pariétaux. Les lignées (races) pures de chien sont très fréquemment atteintes d'épilepsie : leur étude devrait être particulièrement fructueuse puisque des lignées de chiens atteints ont été dérivées dans une quarantaine de « races » différentes. Dans la lignée *Lagotto Romagnolo*, une mutation non-sens, biallélique, a été trouvée. La pénétrance de l'épilepsie est presque totale lorsque cette mutation est présente à l'état homozygote. Il s'agit d'une mutation tronquante dans la 7^e répétition EAR. La protéine Lgi4, quant à elle, semble n'avoir aucun rôle majeur au niveau du système nerveux central. Elle contrôlerait l'interaction entre les neurones et les cellules de Schwann. En l'absence de sa sécrétion, les cellules de Schwann sont incapables de myéliniser correctement les neurones périphériques.

Depuis une dizaine d'années, Lgi1 fait l'objet de recherches. Le groupe dirigé par Masaki Fukata a publié en 2006 dans la revue *Science* une étude qui attribuait à Lgi1 un rôle post-synaptique (Fukata *et al.*, 2006). Le point de départ a été l'immunoprécipitation d'un complexe protéique, formé de Lgi1 et de trois protéines, PSD-95 (protéine sous-membranaire à domaines PDZ, post-synaptique, impliquée dans l'organisation et la plasticité synaptique), la stargazine (régulateur du trafic intracellulaire des récepteurs AMPA), et un des membres de la grande famille des protéines ADAM (protéines transmembranaires qui, pour la plupart, ont une activité

métalloprotéase), ADAM22, dépourvue d'activité catalytique ; ADAM22 possède une séquence de liaison aux domaines PDZ. Toutes ces protéines ont été impliquées dans diverses formes d'épilepsie. L'interaction entre Lgi1 et ADAM22 a été définie au plan biochimique, et la colocalisation de ADAM 22 et de Lgi1 a été montrée dans le gyrus denté et la région CA1 de l'hippocampe. Puis, sur tranches d'hippocampe, les auteurs ont observé une potentialisation des courants AMPA en présence de Lgi1. Ils ont conclu que Lgi1, protéine extracellulaire, se fixe à ADAM22 *via* son domaine EAR, et que cette fixation a pour conséquence un renforcement de l'activité des synapses glutamatergiques avec une surreprésentation des récepteurs AMPA par rapport aux récepteurs NMDA. La localisation de ADAM22 au niveau de la présynapse indiquait que Lgi1 pouvait former un pont entre la pré- et la post-synapse.

Le groupe dirigé par Bernd Fakler a donné la même année, dans un article publié dans la revue *Neuron* (Schulte *et al.*, 2006), une interprétation différente du rôle de Lgi1. Alors que le précédent complexe protéique susmentionné avait été obtenu à partir d'une immunoprécipitation de PSD95, celui sur lequel se fondait l'étude du groupe de Bernd Fakler reposait sur l'immunoprécipitation d'une sous-unité d'un canal potassique dépendant du voltage, Kv1.1. Ces canaux potassiques sont impliqués dans la repolarisation des neurones et, donc, dans la forme des potentiels d'action dans le système nerveux central. Ils contrôlent ainsi, en particulier, le profil de décharge des neurones, qui module la libération du neurotransmetteur. Kv1.1 est une sous-unité abondante des canaux Kv dans le cerveau, et elle est principalement localisée au niveau des axones et de leurs terminaisons. Une analyse par spectrométrie de masse d'un complexe protéique formé avec la sous-unité Kv1.1 a permis d'identifier un certain nombre de protéines, parmi lesquelles ADAM22 et Lgi1. L'existence d'une interaction *in vivo* entre la sous-unité Kv1.1 et Lgi1 était aussi possible *in vivo*, puisque la colocalisation des deux protéines était observée. Par des expériences effectuées dans des œufs de xénope, les auteurs ont montré que Lgi1 antagonise l'effet inhibiteur de Kv1.1. Lgi1 prolongerait donc la stimulation de la présynapse, donc la libération du neurotransmetteur, d'où l'effet d'hyperexcitabilité synaptique qui déclenche la crise d'épilepsie. Cette épilepsie temporaire impliquerait donc des circuits excitateurs, et pourrait mettre en jeu des mécanismes à la fois dans la pré-synapse et dans la post-synapse. Un article récent du groupe de Matthew Anderson publié dans la revue *Nature Medicine* (Zhou *et al.*, 2009) éclaire le rôle de Lgi1 par l'étude de deux modèles murins, l'un dans lequel la protéine exprimée par le transgène exerce un effet dominant négatif, et l'autre dans lequel un nombre accru de copies du gène s'expriment. Les synapses étudiées sont celles que forme le faisceau médian perforant de l'hippocampe avec les neurones granulaires. Au jour P21, ADAM22 et Lgi1 se co-localisent à cet emplacement. Les enregistrements électrophysiologiques des expériences de facilitation par *paired-pulse* (dans lesquelles la répétition de la stimulation augmente la réponse synaptique) montrent un défaut d'acquisition de cette réponse de facilitation (généralement attribuée à la présence de Ca²⁺ résiduel après la première stimulation) quand Lgi1 est en quantité insuffisante. De plus, chez les souris normales, l'acquisition de la facilitation est parallèle à l'augmentation d'expression de *Lgi1*. En d'autres termes, Lgi1 agit sur la maturation neuronale. En utilisant la dendrotoxine, un bloqueur du canal Kv1, les auteurs ont montré un effet sur la réponse de type *paired-pulse*. Cette absence de maturation de la réponse *paired-pulse* trouve sa place dans le cadre de l'épilepsie, puisque la mise en place de cette réponse durant le développement normal s'accompagne d'une diminution de la probabilité de libération du neurotransmetteur. Quand Lgi1 est absent, une forte libération du

neurotransmetteur se maintiendrait donc. Un autre élément de maturation des synapses glutamatergiques a été étudié dans ces modèles : le rapport des sous-unités NR2B/NR2A composant les récepteurs NMDA du glutamate, qui diminue au cours de la maturation synaptique normale. En utilisant différents bloqueurs des sous-unités NR2, les auteurs ont pu conclure que la baisse du rapport NR2B/NR2A est marginale quand la quantité de *Lgi1* est réduite. En conséquence, *in vivo*, *Lgi1* agit sur la maturation de la pré-synapse et de la post-synapse. De plus, l'absence de *Lgi1* se traduit par un effet sur la morphologie dendritique. Chez les souris normales, les dendrites apicales des cellules granulaires croissent, et deviennent larges et hautement arborisées durant les deux premières semaines postnatales. Puis elles se rétractent et deviennent plus étroites durant la 3^e semaine et la densité des épines dendritiques baisse. Chez les souris qui expriment peu de *Lgi1*, l'arborisation dendritique reste de type immature et la densité des épines dendritiques ne diminue pas. À l'inverse, les souris chez lesquelles *Lgi1* est en excès ont des dendrites qui se rétractent et sont éliminées. Au total, l'expression de *Lgi1* durant la période postnatale de développement, non seulement coordonne la maturation des fonctions pré- et post-synaptiques, mais aussi remodèle les branches de l'arbre dendritique et les épines dendritiques. L'ensemble des travaux indique donc que cette forme d'épilepsie aurait pour origine un arrêt du processus de maturation de l'arbre dendritique. Quant à *Lgi2*, il est très fortement exprimé durant la phase de construction des circuits neuronaux, puis son expression diminue et reste en plateau durant la phase d'élimination des branches dendritiques. Un rôle a été proposé pour la protéine *Lgi2* dans la préparation de l'arbre dendritique avant le stade d'élagage des branches de l'arbre dendritique sous l'effet de *Lgi1*.

Le travail fait sur la protéine *Lgi1* illustre ce que l'on peut attendre d'études approfondies des diverses formes d'épilepsie, et contribue à l'indispensable socle de connaissances pour élaborer de nouvelles approches thérapeutiques.

La bibliographie correspondante se trouve sur le site Internet du Collège de France.

ACTIVITÉ DE RECHERCHE DU LABORATOIRE

Caractérisation du rôle de la protéine Sans dans le complexe moléculaire associé au lien apical des stéréocils (*tip-link*)

(E. Caberlotto, V. Michel, I. Foucher, A. Bahloul, E. Pepermans, N. Michalski, I. Perfettini, O. Alegria-Prevot, S. Chardenoux, J.-P. Hardelin, J. Boutet de Monvel, D. Weil, C. Petit, collaboration avec P. Avan, R. Goodyear & G. Richardson) (Caberlotto *et al.*, 2011).

L'ouverture des canaux de la transduction mécano-électrique des cellules sensorielles auditives est contrôlée par les liens apicaux des stéréocils (*tip-links*). Ces liens sont constitués de cadhérine-23 et protocadhérine-15, qui sont codées par les gènes responsables des formes USH1D et USH1F du syndrome de Usher de type 1. Nous avons précédemment émis l'hypothèse de la formation d'un complexe moléculaire par les 5 protéines Usher-1 identifiées. Nous avons montré que la protéine codée par le gène USH1G, Sans, qui est vraisemblablement une protéine d'échafaudage, interagit *in vitro* avec les domaines cytoplasmiques de la cadhérine-23 et de la protocadhérine-15, et n'est plus présente dans la touffe ciliaire de souris mutantes dépourvues de l'une ou l'autre de ces cadhérines, ce qui valide ces

interactions *in vivo*. Grâce à l'étude morphologique et électrophysiologique de souris mutantes conditionnelles qui perdent la protéine Sans dans les cellules ciliées après la période de maturation de la touffe ciliaire, nous avons pu montrer que la protéine Sans est un constituant du complexe moléculaire associé au lien apical (*tip-link*), dont elle conditionne le maintien dans les cellules matures. Chez ces souris mutantes, les stéréocils des petite et moyenne rangées régressent jusqu'à disparaître presque totalement, ce qui suggère que la machinerie de transduction mécano-électrique (dont l'activation est contrôlée par le lien apical) exerce un rôle activateur sur la polymérisation des filaments d'actine au sommet des stéréocils de ces deux rangées.

Caractérisation du rôle de la stéréociline dans le contact entre les stéréocils des cellules ciliées externes et la membrane tectoriale, ainsi que comme composant des liens entre stéréocils (*top connectors*)

(E. Verpy, M. Leibovici, N. Michalski, C. Houdon, D. Weil, C. Petit, collaboration avec R. Goodyear & G. Richardson) (Verpy *et al.*, 2011)

La stéréociline est la protéine défectueuse dans la forme de surdité récessive DFNB16. Nous avons  tudi e la distribution de cette protéine chez la souris au cours de la maturation des cellules sensorielles de l'oreille et dans l'oreille mature, par immunofluorescence et en microscopie électronique. La st er ociline est associée à deux structures particulières de la touffe ciliaire des cellules ciliées externes matures : d'une part, les liens interst er ociliaires latéraux (*top connectors*) qui unissent les régions apicales des stéréocils adjacents, et d'autre part les attaches des stéréocils de la grande rangée à la membrane tectoriale sus-jacente. Chez les souris mutantes dépourvues de st er ociline, les liens interst er ociliaires latéraux ne se forment pas et la cohésion de la touffe ciliaire des cellules ciliées externes se d eteriore après 10 jours de vie. Par ailleurs, ces souris ont perdu l'empreinte normalement laissée par les stéréocils les plus grands à la face inférieure de la membrane tectoriale, en accord avec la perte des liens d'ancrage à cette membrane.   partir de deux semaines de vie, les liens interst er ociliaires apicaux (*tip-links*) disparaissent progressivement, et une surdité sévère s'installe. Nous avons précédemment montré qu'avant l'apparition de la surdité, les produits acoustiques de distorsion, qui sont normalement d etect es, étaient absents chez ces souris. La mise en évidence de liens entre les stéréocils des cellules ciliées externes et la membrane tectoriale invite à rechercher des mutants murins chez lesquels on serait en mesure de dissocier la contribution des *top-connectors* et celle des liens d'attachement à la membrane tectoriale à la génèse des produits de distorsion.

Validation, pour le diagnostic moléculaire du syndrome de Usher, d'une stratégie de séquençage exhaustif des exons codants de tous les gènes impliqu es

(C. Bonnet, M. Grati, S. Marlin, J. Levilliers, J.-P. Hardelin, L. Jonard, A. El-Amraoui, D. Weil, C. Petit, F. Denoyelle, collaboration avec J.-A. Sahel) (Bonnet *et al.*, 2011)

  ce jour, 9 gènes ont été identifi es pour les trois formes cliniques du syndrome de Usher : USH1, USH2, USH3. Les stratégies actuelles de diagnostic moléculaire

de ce syndrome utilisent des puces diagnostiques qui intègrent les mutations déjà identifiées. Nous avons séquençé par la méthode de Sanger les 366 exons codants et régions introniques flanquantes correspondant à ces 9 gènes, chez 54 individus atteints du syndrome de Usher (27 USH1, 21 USH2 et 6 USH3). Des mutations bi-alléliques ont été trouvées chez 39 patients (72 %) et des mutations mono-alléliques chez 10 patients supplémentaires (18,5 %). Chez 7 patients (13 %), en plus des mutations bi-alléliques dans un de ces gènes, des mutations présumées pathogènes ont été détectées dans un autre gène USH. Surtout, les autres méthodes de diagnostic moléculaire actuellement en usage n'auraient détecté que 30 des 81 mutations identifiées par notre étude, dont 39 (48 %) n'avaient pas été décrites précédemment. Cette stratégie de séquençage complet, chez tout individu atteint de la maladie, des exons codants de tous les gènes impliqués jusqu'à présent, augmente donc l'efficacité du diagnostic moléculaire de cette maladie, ce qui est d'une grande importance dans la perspective d'une thérapie génique.

Identification d'un nouveau gène de surdité, *TSPEAR*, responsable d'une surdité profonde de transmission récessive (DFNB98)

(S. Delmaghani, A. Aghaie, N. Michalski, C. Bonnet, D. Weil, C. Petit)
(Delmaghani *et al.*, 2012)

En analysant une famille iranienne consanguine dans laquelle ségrège une surdité congénitale profonde, nous avons caractérisé un nouveau locus de surdité récessive, DFNB98, sur le bras long du chromosome 21, dans un intervalle de 4,8 Mb. Par la technique de séquençage total des exons du génome, nous avons identifié une mutation tronquante du gène *TSPEAR*, présente à l'état homozygote chez les individus atteints. Ce gène code une protéine sécrétée, contenant sept domaines EAR (*epilepsy-associated repeats*). Nous l'avons détectée, par immunofluorescence, à la surface de la touffe ciliaire des cellules sensorielles auditives chez la souris. La famille des protéines EAR comporte six membres, dont quatre (LG1, LG2, VLGR1, *TSPEAR*) sont impliqués dans des maladies concernant le système auditif (épilepsies avec symptômes auditifs ou surdités). Ainsi, cette famille de protéines semble jouer un rôle essentiel dans le développement et le fonctionnement du système auditif.

Mise en évidence, dans les processus caliciels des cellules photoréceptrices de la rétine chez les primates, des cinq protéines impliquées dans le syndrome de Usher de type 1

(I. Sahly, E. Dufour, C. Schietroma, V. Michel, A. Bahloul, I. Perfettini, E. Pepermans, A. Estivalet, D. Carette, A. Aghaie, I. Ebermann, A. Lelli, M. Iribarne, J.-P. Hardelin, D. Weil, J.-A. Sahel, A. El-Amraoui, C. Petit)
(Sahly *et al.*, 2012)

La pathogénie de la dystrophie rétinienne du syndrome de Usher de type 1 (USH1) reste incomprise car les souris mutantes pour les différents gènes responsables de ce syndrome, bien qu'elles en reproduisent le déficit auditif, n'ont cependant pas de dégénérescence de la rétine. Nous avons montré que dans les cellules photoréceptrices (cônes et bâtonnets) du singe macaque, toutes les protéines USH1 (myosine-7a, cadhérine-23, protocadhérine-15, harmonine, et Sans) sont colocalisées aux interfaces membranaires entre les segments interne et externe

d'une part, et entre les processus caliciels et le segment externe d'autre part. Ce profil d'expression est conservé chez les amphibiens et chez l'homme, mais pas chez la souris, dont les cellules photoréceptrices sont pratiquement dépourvues de processus caliciels. Nos résultats suggèrent que les protéines USH1 contribuent à une ceinture d'adhérence autour de la région baso-latérale du segment externe des photorécepteurs chez l'homme, et qu'un défaut de cette structure est vraisemblablement à l'origine de la dégénérescence rétinienne dans le syndrome USH1. Une vision holistique se construit donc autour des gènes USH1. Ils codent pour un complexe d'adhésion liant des microvillosités (stéréocils ou processus caliciels) entre elles ou à un cil. Reste à élucider si, comme dans la touffe ciliaire des cellules sensorielles auditives, ce complexe est associé dans les photorécepteurs à une fonction de mécanotransduction.

Principes de stimulation des cellules sensorielles auditives par la membrane tectoriale

(A.N. Lukashkin, P.K. Legan, T.D. Weddell, V.A. Lukashkina, R.J. Goodyear, L. Welstead, C. Petit, I.J. Russell, G.P. Richardson, 2012)

L'épithélium sensoriel de la cochlée, l'organe de Corti, est idéalement positionné pour la détection des vibrations en réponse au son, entre deux membranes, la membrane basilaire sur laquelle il repose, et la membrane tectoriale, gel acellulaire, qui le recouvre. Un processus actif d'amplification, impliquant la production de forces par les cellules ciliées externes (CCE), module l'interaction mécanique de ces deux membranes. Cette amplification peut multiplier localement l'amplitude de vibration d'un facteur voisin de 1000, déterminant ainsi la capacité de l'oreille à percevoir des sons très faibles, ainsi que son pouvoir de résolution en fréquence. Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer le rôle de la membrane tectoriale dans la stimulation des CCE. Elle pourrait agir comme un résonateur ou comme une masse inertielle. Nous avons pu trancher entre ces hypothèses grâce à l'étude de souris mutantes *Otoa^{EGFP/EGFP}* dépourvues d'otoancorine, une protéine présente exclusivement dans la membrane tectoriale. Chez ces souris, la membrane tectoriale est détachée de son point d'ancrage dans la région limbique du canal cochléaire (située du côté des cellules ciliées internes, CCI), mais elle reste couplée aux touffes ciliaires des CCE. Cependant, il y a disparition complète de la résonance de la membrane tectoriale observée chez les souris non-mutantes. Or cette situation ne perturbe pas la stimulation des CCE, et on observe une amplification et une sélectivité fréquentielle des vibrations de la membrane basilaire pratiquement normales chez ces mutants. C'est donc l'inertie de la membrane tectoriale, et non sa résonance, qui joue un rôle majeur dans la stimulation des CCE en déterminant le mode de déflexion de leurs touffes ciliaires avec une phase ajustée pour permettre une amplification mécanique efficace. En revanche, la sensibilité des CCI est significativement altérée chez les souris *Otoa^{EGFP/EGFP}*. Ceci établit le rôle essentiel du flux liquidien produit par les forces de cisaillement entre la membrane tectoriale et la surface apicale de l'organe de Corti dans la stimulation des touffes ciliaires de ces cellules.

PRINCIPALES PUBLICATIONS 2011-2012

Avan P., Büki B., Petit C., « Auditory Distortions: Origins and Functions », *Physiol Rev.*, 2013, sous presse.

Bonnet C., El-Amraoui A., « Usher syndrome (sensorineural deafness and retinitis pigmentosa): pathogenesis, molecular diagnosis and therapeutic approaches », *Curr. Opin. Neurol.*, 25, 2012, 42-9.

Boulay A.-C., del Castillo F.J., Giraudet F., Hamard G., Giaume C., Petit C., Avan P., Cohen-Salmon M., « Hearing is normal without Connexin30 », *J. Neurosci.*, 33, 2013, 430-4.

Delmaghani S., Aghaie A., Michalski N., Bonnet C., Weil D., Petit C., « Defect in the gene encoding the EAR/EPTP domain-containing protein TSPEAR causes DFNB98 profound deafness », *Hum. Mol. Genet.*, 21, 2012, 3835-44.

El-Amraoui A., Petit C., « Human inherited disorders involving cadherin superfamily members », in Conn P.M. (éd.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Elsevier, 2012, sous presse.

Lukashkin A.N., Legan P.K., Weddell T.D., Lukashkina V.A., Goodyear R.J., Welstead L., Petit C., Russell I.J., Richardson G.P., « A mouse model for human deafness DFNB22 reveals that hearing impairment is due to a loss of inner hair cell excitation », *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 2012, 19351-6.

Petit C., El-Amraoui A., Avan P., « Audition: Hearing and Deafness », in Pfaff D.W. (éd.), *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*, Heidelberg, Springer Verlag, 2012, 675-741.

Safieddine S., El-Amraoui A., Petit C., « The auditory hair cell ribbon synapse: From assembly to function », *Annu. Rev. Neurosci.*, 35, 2011, 509-28.

Sahly I., Dufour E., Schietroma C., Michel V., Bahloul A., Perfettini I., Pepermans E., Estivalet A., Carette D., Aghaie A., Ebermann I., Lelli A., Iribarne M., Hardelin J.-P., Weil D., Sahel J.-A., El-Amraoui A., Petit C., « Localization of Usher 1 proteins to the photoreceptor calyceal processes, which are absent from mice », *J. Cell. Biol.*, 199, 2012, 381-99.

Caberlotto E., Michel V. *et al.*, Weil D., Petit C., « Usher type 1G protein sans is a critical component of the tip-link complex, a structure controlling actin polymerization in stereocilia », *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 2011, 5825-30.

Caberlotto E., Michel V., Boutet de Monvel J., Petit C., « Coupling of the mechanotransduction machinery and F-actin polymerization in the cochlear hair bundles », *BioArchitecture* 1, 2011, 1-6.

Richardson G.P., Boutet de Monvel J., Petit C., « How the genetics of deafness illuminates auditory physiology », *Annu. Rev. Physiol.*, 73, 2011, 311-34.

AUTRES ENSEIGNEMENTS AU TITRE DU COLLÈGE DE FRANCE

Cours à l'étranger : Pékin, Chine

Professeure invitante : Qiuju Wang (Chinese PLA Medical School, Beijing, Chine), 11 novembre 2011.

1. New approaches to deafness diagnosis: molecular and clinical aspects.
2. Cochlear physiology: breakthroughs resulting from the understanding of inherited forms of deafness.

