

Régénération postlésionnelle des cellules sensorielles vestibulaires : bilan et espoirs

Sylvain Bartolami
Mireille Montcouquiol
Cécile Travo
Alain Sans

Chez les mammifères, la destruction des cellules ciliées sensorielles de l'oreille interne entraîne une surdité neurosensorielle et des troubles de l'équilibre. L'absence de remplacement des cellules cochléaires détruites entraîne l'irréversibilité des lésions auditives [1]. En revanche, il semble que la régénération des cellules ciliées vestibulaires soit possible. La connaissance des mécanismes de réparation vestibulaire permettrait de comprendre les processus empêchant la réapparition des cellules ciliées auditives et d'ouvrir ainsi la voie à des recherches visant au traitement de la surdité neurosensorielle. Dans cette revue, nous présenterons très succinctement la structure du vestibule, avant de décrire les travaux ayant permis la découverte du pouvoir régénératif des cellules ciliées du vestibule.

L'oreille interne est formée d'une partie auditive (la papille basilaire chez les oiseaux, et la cochlée chez les mammifères) et d'une partie vestibulaire. Cette dernière est responsable de la détection des accélérations de mouvement linéaires et angulaires et à ce titre, contribue fortement au maintien de l'équilibre. Afin d'accomplir cette tâche, le vestibule est doté de structures mécanoréceptrices, les cellules ciliées (CC). Celles-ci captent les mouvements par déplacement de leurs touffes de stéréocils qui baignent dans un compartiment liquidien, l'endolymphe. Une fois stimulées, les CC transforment les signaux mécaniques en messages bioélectriques et les transmettent aux neurones du ganglion vestibulaire

qui conduisent l'information sensorielle au tronc cérébral. Chez les vertébrés supérieurs, on distingue les cellules ciliées de type 1 et celles de type 2 (CC1 et CC2). Elles diffèrent respectivement par un corps cellulaire en forme de poire, englobé dans une terminaison afférente calicéale pour les CC1, et un corps cellulaire plus cylindrique, innervé par des terminaisons afférentes et efférentes en « boutons » pour les CC2. Ces deux types de cellules hautement spécialisées sont entourées par des cellules de soutien (CS) issues du même lignage que les CC. Les CC, leurs innervations et les CS constituent l'épithélium neurosensoriel, séparé du stroma mésenchymateux par une lame basale (figure 1). Le vestibule possède cinq épithéliums neu-

ADRESSES

S. Bartolami, C. Travo, A. Sans : Inserm U. 432, Université Montpellier II, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France. M. Montcouquiol : Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, University of Virginia, Charlottesville, États-Unis.

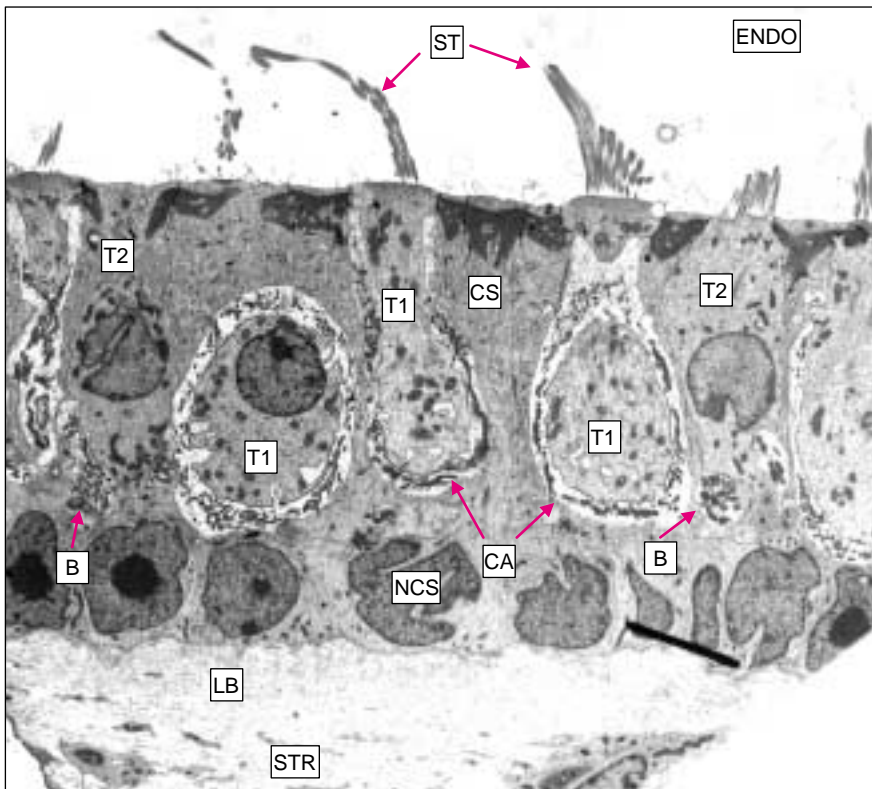


Figure 1. **Épithélium neurosensoriel vestibulaire de cobaye, observé en microscopie électronique à transmission.** L'épithélium est constitué par les cellules ciliées de type 1 et 2 et les cellules de soutien, et est séparé du stroma mésenchymateux par une lame basale. Les cellules ciliées portent une touffe de stéréocils baignant dans l'endolymphe (un liquide propageant les stimulations mécaniques) et sont innervées par des terminaisons en bouton pour les cellules de type 2 et des calices afférents pour les cellules de type 1. Seules les cellules de soutien traversent entièrement l'épithélium puisque leurs noyaux sont alignés sur la lame basale et que leurs domaines apicaux sont en contact avec l'endolymphe. ENDO: endolymphe; ST: stéréocils; CS: cellules de soutien; T1: cellules ciliées de type 1; T2: cellules ciliées de type 2; CA: calice afférent; B: terminaison en bouton; NCS: noyaux des cellules de soutien; LB: lame basale; STR: stroma. Agrandissement: 2000 x.

rosensoriels reposant sur le plancher de cinq organes récepteurs remplis d'endolymphe: trois crêtes pour détecter les accélérations angulaires et deux macules, l'utricule* et le saccule*, pour détecter les accélérations linéaires.

La fin d'un dogme

Jusqu'aux années 1990, il était communément admis qu'à l'exception de certains vertébrés inférieurs chez les-

* L'utricule et le saccule sont deux épithéliums neurosensoriels disposés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre. Ainsi, l'utricule reçoit les stimulations verticales et le saccule répond aux accélérations horizontales.

quels les CC sont produites durant toute la vie, les cellules ciliées des vertébrés sont quasiment toutes produites au cours de l'embryogenèse [2]. Cette quiescence mitotique postnatale expliquait, à elle seule, que la perte de ces cellules, causée par divers facteurs tels que des antibiotiques [3], des polluants [4], le vieillissement [5], ou la formation de tumeurs [6], entraîne des déficits neurosensoriels irrémédiables, dans le vestibule comme dans la cochlée.

En réalité, le dogme de l'absence de production postnatale de CC chez les vertébrés supérieurs a été remis en cause avec la découverte de la production continue de CC dans les épithéliums vestibulaires chez les per-

ruches adultes [7], et les poulets âgés de 12 jours [8]. En outre, la production de CC est accrue à la suite d'une lésion de l'épithélium vestibulaire de poulet, permettant ainsi la réparation du tissu sensoriel [9]. Chez les oiseaux, un phénomène de régénération identique a été observé dans l'épithélium auditif, après un traumatisme acoustique [10, 11]. Dans ce cas, le renouvellement des CC s'accompagne de la récupération de la fonction auditive [12]. En revanche, chez les mammifères, la régénération auditive postlésionnelle n'a jamais été observée [13], peut être parce que l'épithélium auditif de mammifère est structurellement très différent de celui des oiseaux, plus proche des épithéliums vestibulaires. En effet, l'organe de Corti, spécifique de l'appareil auditif des mammifères est absent dans celui des oiseaux. Ce dernier est organisé en un feuillet plat et continu, dans lequel les CC sont isolées les unes des autres par les CS, comme dans le saccule et l'utricule.

Prolifération postnatale des cellules de soutien dans le vestibule

Chez les oiseaux, la production de CS est continue

Dès 1988, Jorgensen et Mathiesen ont montré que l'ADN des CC et des CS aviaires adultes sont capables d'incorporer un marqueur de phase S, suggérant que les deux types cellulaires sont produits par mitose [7]. Ce résultat, confirmé en 1992 [8], indique qu'un potentiel mitotique persiste dans le vestibule adulte, et conduit au renouvellement physiologique des CC dans les épithéliums intacts. De plus, les CC sont soumises en permanence à un phénomène de mort cellulaire programmée [14]. La durée de vie d'une CC du vestibule aviaire est d'environ vingt jours, mais l'apoptose ne perturbe pas la fonction vestibulaire puisqu'elle est compensée par la production continue de nouvelles cellules [7, 8, 14]. Cependant, l'observation de l'incorporation *in vivo* de thymidine tritiée ou de bromodésoxyuridine (BrdU) dans l'ADN des CC et des CS ne permet pas de savoir si les deux types cellulaires entrent de nouveau dans

le cycle cellulaire, ou si elles proviennent de cellules souches ayant accumulé les marqueurs de synthèse d'ADN avant de se diviser. La régénération des CC est-elle alors issue de la prolifération postnatale de CC « survivantes », de CS ou de cellules souches? Un début de réponse est apporté par l'observation *in vitro* d'une prolifération continue de CS [15]. Cette multiplication des CS est indépendante de facteurs mitogènes présents dans le sérum ou le tissu conjonctif sous-jacent. Les facteurs nécessaires à la prolifération continue des CS aviaires sont donc intrinsèques à l'épithélium.

L'effet des antibiotiques aminoglycosidiques sur la prolifération des CS aviaires a été largement étudié, car les lésions épithéliales dues à ces traitements sont compensées, au moins partiellement, par la néoformation de CC [9]. L'apoptose des CC causée par les aminoglycosides [14] stimule la division des CS et conduit à la production de nouvelles CC *in vitro* [16] et *in vivo* [9, 17]. La régénération épithéliale nécessite l'entrée des CS dans le cycle cellulaire, ainsi que la migration de leurs noyaux de la base de l'épithélium vers la couche luminale formée par les CC [17]. Ce n'est qu'après cette migration nucléaire que les CS se divisent, comme l'attestent les figures de mitose observées à l'étage luminal [17].

Aucune cellule souche n'ayant été identifiée dans le vestibule postnatal, ces données suggèrent que chez les oiseaux, les cellules génératrices des CC sont les CS, dont la prolifération continue est accrue dans le cas d'une destruction par les aminoglycosides (streptomycine, gentamicine, *figure 2*).

La destruction des CC entraîne la division des CS des mammifères

Chez les mammifères, il n'y a pas de production évidente de CC dans le vestibule intact tant *in vivo* [18] qu'*in vitro* [19]. En revanche, après destruction des CC par la gentamicine, la prolifération des CS est activée dans les macules vestibulaires matures chez le cobaye et l'homme, et s'accompagne de l'apparition de nouvelles cellules [18-20]. Chez le chinchilla, après un traitement à la gentamicine (0,1 mg appliqué dans la périlymphe), qui élimine toutes les

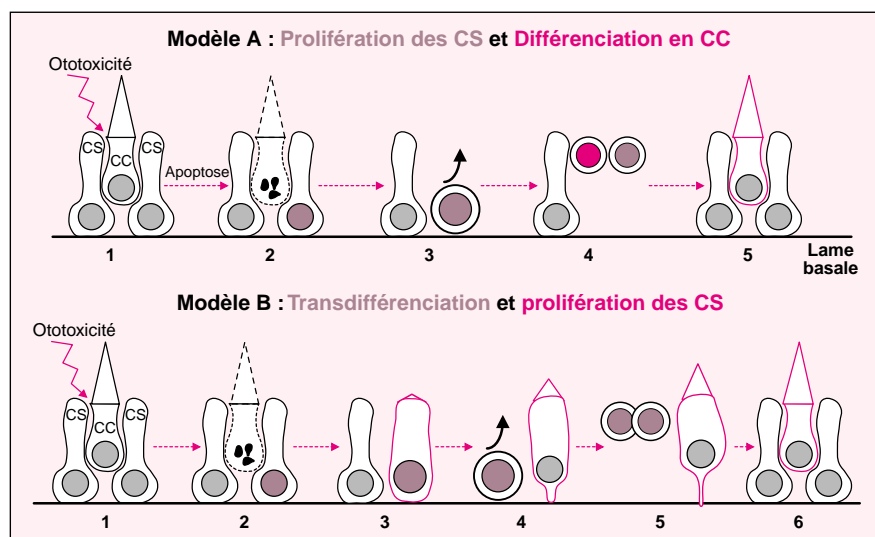


Figure 2. **Les deux modèles principaux de régénération des CC.** Selon le modèle A, très documenté chez les oiseaux, l'apoptose des CC (1-2) induit l'entrée des CS dans le cycle cellulaire (3). Celles-ci se divisent à la suite de la migration nucléaire vers l'étage luminal (4) et les cellules filles se différencient en CS et en CC (5). D'après le modèle B, la lésion des CC (1-2) provoque la conversion phénotypique de certaines CS en CC (3-6). Cette transdifférenciation est indiquée par la réduction du contact avec la lame basale alors que la maturation des stéréocils progresse. Peu après le début de la transdifférenciation, des CS entrent en mitose (4-5) et engendrent des cellules filles qui se différencient uniquement en CS (6). Ceci permet de compenser la « perte » des CS transdifférenciées en CC. Le modèle de la transdifférenciation serait prépondérant dans le vestibule des batraciens et peut-être des mammifères.

CC en laissant indemnes les CS, des CC sont régénérées dans les crêtes, confirmant ainsi que les CS sont susceptibles de donner naissance aux CC [21, 22]. Enfin, les CC néoformées possèdent les caractéristiques morphologiques des CC2 [18, 20-28]. Il semble donc que dans le vestibule mature des mammifères, la régénération des CC soit possible à la suite de la multiplication des CS. Mais la production de CC est uniquement post-lésionnelle puisque aucune division cellulaire n'apparaît sans la perte préalable de CC. Enfin, le taux de prolifération dans le vestibule des mammifères étant bien plus faible que chez les oiseaux, la capacité de régénération de ces épithéliums demeure limitée [28].

Des facteurs de croissance contrôlent la mitose des cellules de soutien

S'il apparaît clairement que la perte des CC est le déclencheur général de la multiplication des CS, les proces-

sus précis de l'activité mitogénique de ces cellules restent mal connus. Parmi les mécanismes possibles induisant l'entrée des CS dans le cycle cellulaire, deux hypothèses ont été retenues: (1) la levée d'une inhibition normalement exercée par les CC de manière paracrine ou par contact cellulaire, et (2) la libération de facteurs de croissance par les cellules épithéliales [15]. Ainsi, lorsque plusieurs utricules aviaires normaux sont co-cultivés, leur prolifération continue diminue, suggérant que les tissus sains contrôlent la multiplication des CS par des agents diffusibles [23]. L'un d'eux serait le TGF β (*transforming growth factor* β) qui *in vitro*, a un effet antimitotique dans l'utricule de rat nouveau-né [24]. Au niveau intracellulaire, cet effet serait relayé par l'inhibiteur de kinases « cycline-dépendantes » ou p27 [25] dont l'invalidation génique provoque la multiplication des CS, et l'apparition de CC surnuméraires dans la cochlée [26]. En revanche, lorsque des épithéliums normaux de poulet sont co-cultivés avec des épithéliums

lésés, la prolifération cellulaire augmente dans les tissus sains, indiquant que des facteurs mitogènes diffusent à partir des organes lésés [23].

Les mitogènes potentiels

La division des CS est stimulée *in vitro* par les facteurs de croissance suivants : IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*), insuline, GGF2 (*glial growth factor 2*), neu (*neu-differentiation factor*), TGF α (*transforming growth factor α*), FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) et EGF (*epidermal growth factor*) en combinaison avec l'insuline. Au-delà de l'identification de mitogènes vestibulaires, il est important de noter que l'impact de ces molécules varie selon l'espèce et le stade développemental. Ainsi, l'IGF-1 est un puissant mitogène chez les oiseaux adultes, même en l'absence de lésion [27], alors que chez le rat son effet prolifératif est restreint au stade néonatal [24]. Dans ces tissus murins immatures, l'incorporation de marqueurs de phase S est aussi induite par le FGF 2, l'insuline [24], le facteur neu [28] et le GGF2, qui semble être le facteur mitogène le plus puissant dans ce modèle [29, 30]. Cependant, l'action proliférative du GGF2 disparaît graduellement avec la maturation des épithéliums [30]. Enfin, dans les utricules de souris adultes en culture, la division cellulaire est stimulée par le TGF α associé à l'insuline [31]. Par ailleurs, *in vivo*, le TGF α , administré avec de l'insuline dans l'oreille interne, stimule la synthèse d'ADN dans l'utricule de rat adulte [32].

Récepteurs tyrosine-kinases et signalisations intracellulaires

Le point commun de tous ces mitogènes est leur mode d'action *via* des récepteurs ayant des activités tyrosine-kinases, dont certains ont été détectés dans l'utricule de rat postnatal par immunocytochimie. Il s'agit des récepteurs aux neurotrophines TrkB et TrkC dans les neurones vestibulaires afférents [33] et des récepteurs pour le FGF2, l'IGF-1, le PDGF (*platelet-derived growth factor*), le GGF2 et le facteur neu dans les épithéliums [24, 28, 34]. Enfin, les ARNm des récepteurs de l'EGF et de l'insuline sont exprimés dans l'utricule de rat [34].

La liaison du ligand sur les récepteurs tyrosine-kinases provoque d'abord leur dimérisation suivie d'une série de phosphorylations sur des résidus tyrosine, qui peuvent activer plusieurs voies de transduction (*figure 3*): (1) synthèse de diacylglycérol et d'inositol triphosphate par la phospholipase C; (2) activation de la phosphatidylinositol-3-kinase, puis des kinases S6 et (3) stimulation du proto-oncogène ras qui déclenche la cascade des «MAP» kinases. Ces voies de transduction complexes aboutissent à l'activation de facteurs de transcription indispensables à la prolifération. Les systèmes de transduction liés à l'effet mitogène du GGF2 ont été caractérisés dans les utricules murins. L'action du GGF2 est réduite par la forskoline à forte concentration, suggérant une inhibition *via* la protéine kinase A [29]. En revanche, la prolifération due au GGF2 dépend principalement de trois types de kinases : les protéines kinases C, les MAP kinases et surtout la phosphatidylinositol-3-kinase (*figure 3*) [35]. Les résultats ci-dessus révèlent surtout la grande complexité de la signalisation inter et intracellulaire nécessaire à la régénération des CC. L'activation des récepteurs tyrosine-kinases par les facteurs de croissance semble jouer un rôle central dans la prolifération des CS, mais cette prolifération est également inversement contrôlée par des tyrosine-phosphatases, telle que la *receptor-like protein tyrosine phosphatase*, exprimée par les CS de poulet [36]. Enfin, la régénération des CC doit aussi restaurer l'organisation générale de l'épithélium, selon laquelle chaque CC est entourée par des CS. Cette étape impliquerait le système d'inhibition latérale relayé par Notch 1 et Delta 1 dont l'expression est accrue après lésion épithéliale [37].

Différenciation postlésionnelle des CC

La prolifération des CS étant le préambule à une régénération éventuelle des CC, il reste néanmoins à déterminer si les CS issues de mitose se différencient en CC.

Des CS aux CC1

Chez les oiseaux traités par la streptomycine, le devenir postlé-

sionnel des épithéliums a été suivi à long terme [38, 39]. Une étude réalisée par microscopie électronique à balayage montre qu'après la disparition de tous les stéréocils de l'utricule de pigeon, ceux-ci réapparaissent progressivement : d'abord dans les régions normalement riches en CC2, puis dans la zone riche en CC1 [39]. Cette observation laisse supposer que les CC1 seraient régénérées après les CC2.

Chez des poulets traités *in vivo* aux antibiotiques, l'autoradiographie de coupes de crêtes révèle que des cellules ayant incorporé de la thymidine tritiée se différencient en CS, CC2 et CC1 dans des proportions variables [38]. Vingt jours après le traitement, 57 % des cellules marquées sont des CS, 30 % sont des CC2 et 13 % des CC1. A soixante jours, la proportion de CS marquées n'a statistiquement pas varié, mais on observe à ce stade 21 % de CC2 et 27 % de CC1. La baisse du pourcentage de CC2 et la hausse de celui des CC1 suggèrent que certaines CC2 se différencient en CC1. La séquence d'événements permettant la production post-lésionnelle de CC1 serait la suivante : (1) réplication de l'ADN des CS dans la couche basale; (2) migration des noyaux de CS en phase S-G2 vers la couche luminale; (3) retour d'une cellule fille dans la couche basale après la mitose afin de maintenir une population constante de CS alors que l'autre cellule « fille » se différencie en CC2 (*figure 2, modèle A*); (4) maturation des CC2 et établissement de synapses « en boutons »; (5) différenciation de certaines CC2 en CC1 et acquisition d'une innervation calicéale.

Ainsi, chez les oiseaux, les CC1 peuvent être régénérées par différenciation des CC2. La néosynaptogenèse des calices afférents innervant les CC1 pourrait faire intervenir des neurotrophines libérées par les cellules épithéliales, à l'image de la synaptogenèse décrite chez le rat. Dans ce modèle, le *brain-derived neurotrophic factor* participerait à la mise en place de l'innervation, puisqu'il est synthétisé par les CS et les CC1 [40], et que son récepteur TrkB est exprimé dans les terminaisons afférentes [33].

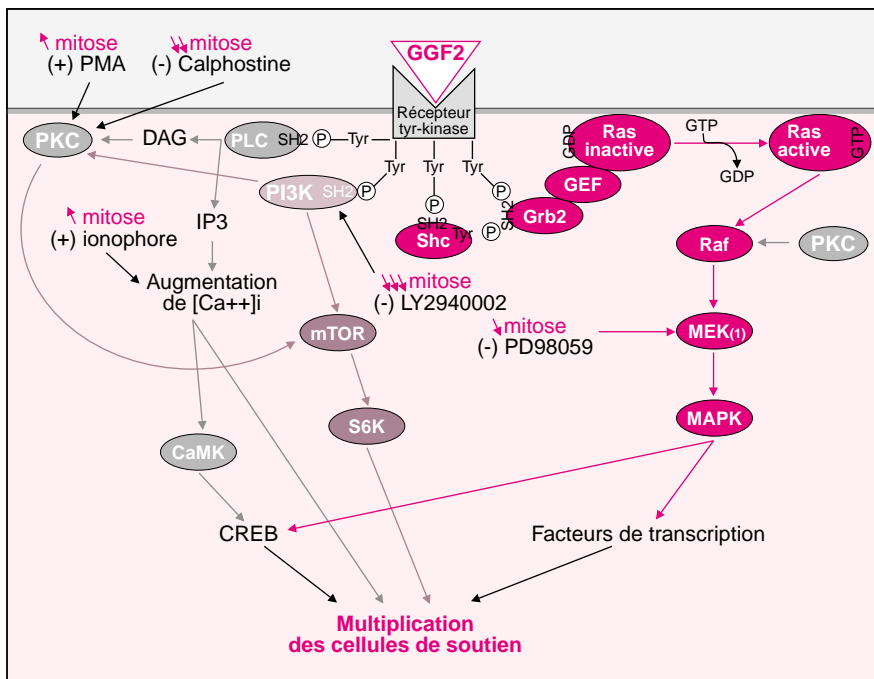


Figure 3. L'effet mitogène du GGF2 implique trois systèmes de transduction. Ces trois cascades intracellulaires sont décrites succinctement et présentées en trois couleurs différentes (gris, violet, rouge). La fixation du GGF2 sur son récepteur provoque l'autophosphorylation de tyrosines du récepteur. Ces tyrosines phosphorylées permettent d'activer des voies de transduction, en interagissant avec des protéines à domaine SH2 telles que la phospholipase C (PLC, en gris) qui catalyse la synthèse du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). Le DAG active la protéine-kinase C (PKC) qui possède de nombreux substrats dont la kinase Raf, dans la voie de transduction des kinases MAP (MAPK, en rouge) et l'enzyme mTOR (pour mammalian target of rapamycin) de la voie de la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K, en violet). En parallèle, l'IP3 induit une élévation de la concentration calcique intracellulaire. Le calcium peut influer directement sur l'expression de gènes nécessaires à la prolifération des CS ou indirectement via la kinase dépendante du calcium et de la calmoduline (CaMK) et via CREB. La PI3K est une autre enzyme à domaine SH2. Lorsqu'elle est activée, la PI3K peut stimuler par phosphorylation directe ou indirecte (via la PKC) la kinase mTOR qui en retour active les kinases S6 (S6K), intervenant dans la multiplication cellulaire. La troisième voie de transduction couplée aux récepteurs « tyrosine-kinases » est celle des MAPK (en rouge). Elle est activée par l'intermédiaire de protéines adaptatrices Shc et Grb2, qui interagissent avec le facteur d'échange de nucléotides guanidiques (GEF). Celui-ci stimule la protéine Ras en favorisant l'échange du GDP par du GTP. Une fois activée, Ras déclenche une cascade de kinases passant par Raf, MEK et MAPK. Enfin, les MAPK peuvent activer des gènes contrôlant la multiplication cellulaire par des phosphorylations de CREB et d'autres facteurs de transcription. Sur des cultures d'utricules de rats nouveau-nés, l'application d'activateurs et d'inhibiteurs* (en noir, précédés respectivement de signes plus ou moins) de certaines protéines des systèmes de transduction, modulent le pouvoir mitogène du GGF2 (mitose en rouge, précédée de flèches). Ces observations indiquent que la multiplication des CS induite par le GGF2 ferait intervenir les trois systèmes de transduction décrits ici. En outre, la voie de la PI3K serait prépondérante car son inhibition provoque une réduction quasi totale du taux de mitose des CS.

* Le PMA est un activateur de la PKC alors que la calphostine l'inhibe. Les ionophores calciques permettent une entrée massive de calcium à l'intérieur de la cellule. Le LY2940002 est un inhibiteur de la PI3K et le PD 98059 bloque les MEK de type 1.

La régénération inachevée chez les mammifères?

Des études quantitatives et ultrastructurales ont permis de préciser les

phases du cycle de dégénérescence/régénération des CC, après intoxication des cellules de l'oreille interne des crêtes de chinchilla par des antibiotiques aminoglycosidiques (ototoxicité) [21, 22]. Une semaine après l'intoxication, seules les CS paraissent indemnes, mais la monocouche de leurs noyaux est désorganisée, et les CC1 ainsi que les fibres nerveuses ont disparu de l'épithélium. Après deux semaines, 87% des CC2 sont perdues, l'épithélium est colonisé par les CS en prolifération. Après un mois, des fibres nerveuses et des petites CC apparaissent de nouveau, alors que les noyaux des CS commencent à se réaligner à la base de l'épithélium. Au bout de deux mois, le nombre de CC atteint 55% de la population initiale, elles acquièrent les caractéristiques de CC2 matures et établissent des contacts synaptiques avec les terminaisons nerveuses.

Chez le cobaye, un mois après ototoxicité, les CC qui apparaissent sont également des CC2 [17] et ne compensent que 50% des pertes en CC, même au bout de 8 mois [19]. Les CC1 de mammifères sont-elles donc vraiment capables de se régénérer? En fait, il est possible que la régénération des CC1 nécessite un long délai de récupération, puisqu'un petit nombre de CC1 est finalement détecté dans l'utricule de cobaye 3 à 8 mois après la lésion [19]. Par ailleurs, certaines CC2 pourraient correspondre à des CC1 immatures innervées par un calice en voie de développement [19]. Il est possible que ces cellules ne soient pas identifiables en tant que telles puisque la présence d'une innervation calicéale est le principal critère morphologique permettant l'identification des CC1. Cependant, il est à noter que la maturation électrophysiologique des CC1 est indépendante de leur innervation [40, 41]. Cette dernière permettrait en revanche le maintien du phénotype, puisque l'énervation entraîne la dédifférenciation des CC [42].

La transdifférenciation

Chez les batraciens, l'ototoxicité conduit à (1) l'apparition de CC immatures non marquées en présence de BrdU; (2) la régénération de CC, qui ne peut s'expliquer uni-

quement par le faible taux de prolifération des CS; (3) la variation inverse des populations de CS et de CC, au profit de l'effectif des CC et (4) l'apparition de nouvelles CC, même en présence d'un agent antimittotique [44, 45]. En outre, *in vitro*, dans des saccules de batraciens en régénération, des cellules possédant à la fois des caractéristiques de CS (noyau basal et prolongement cytoplasmique rejoignant la face lumineuse) et de CC (touffe ciliaire et expression de la calbindine et la parvalbumine) ont été observées. Ces cellules mixtes seraient des CS se transformant en CC [44, 45]. Toutes ces données sont en faveur de l'existence d'une transdifférenciation permettant à certaines CS de devenir des CC, sans entrer dans le cycle cellulaire (figure 2, modèle B). L'avantage de cette conversion phénotypique serait une genèse de CC plus rapide que par différenciation postmitotique.

Chez les mammifères, la possibilité de transdifférenciation est également envisagée. En effet, en présence de thymidine tritiée, des CC immatures non marquées sont présentes dans des utricules post-lésionnels de cobayes adultes [46]. Le nombre de CS entrées dans le cycle cellulaire est également insuffisant pour expliquer la régénération des CC [47]. Enfin, dans des utricules lésés, des cellules intermédiaires entre les CS et CC sont présentes à des degrés variés de conversion [47]. Ces cellules reposent sur la lame basale, mais possèdent un domaine apical doté d'une touffe de stéréocils immatures. Le taux de maturation des stéréocils est inversement proportionnel à l'étendue du contact avec la lame basale. Quel que soit le degré de transdifférenciation, toutes les cellules en conversion sont innervées, et les contacts fibres/cellules présentent des signes de synaptogenèse [47]. Enfin, il se pourrait que la transdifférenciation soit un processus majeur de la régénération des CC chez les mammifères, puisqu'il a été jusqu'à présent impossible de mettre en évidence des noyaux de CC de mammifères ayant incorporé des marqueurs de prolifération (figure 2, modèle B). D'autant plus qu'une diminution transitoire de la population de CS accompagne la réapparition des CC

de cobaye, suggérant que la multiplication des CS sert essentiellement à remplacer les CS converties en CC [20].

Une régénération « amitotique », alternative à la transdifférenciation, pourrait être la réparation du domaine apical des CC atteintes de lésions sublétales. Un tel processus a été décrit dans le saccule de crapaud et l'utricule de rat postnatal, chez lesquels des CC ayant perdu leurs stéréocils par ototoxicité peuvent remplacer ces structures [48, 49]. Cette réparation est indépendante de la prolifération, puisqu'elle est observée en présence d'un agent antimittotique.

La récupération fonctionnelle

Qu'elle fasse suite à la multiplication de CS ou à la transdifférenciation, la réapparition des CC n'est bénéfique que si elle s'accompagne d'une restauration physiologique.

In vivo, l'étude en « patch clamp » des CC régénérées dans des tranches de crêtes de pigeon, montrent que les CC2 néoformées possèdent les mêmes courants ioniques que les CC2 normales [41]. En revanche, les CC1 néoformées n'expriment pas leur conductance potassique spécifique à rectification différée et ont plutôt les propriétés physiologiques de CC2 [41]. Ainsi, à l'inverse des nouvelles CC2, les nouvelles CC1 ne sont pas fonctionnellement mûres; elles nécessitent peut-être une période de régénération plus longue pour recouvrer leur profil électrophysiologique.

La capacité de récupération fonctionnelle a également été testée *in vivo* chez le poulet, par la mesure du potentiel d'action du nerf vestibulaire [50]. Après administration de streptomycine, l'activité du nerf est abolie. La sensibilité du nerf est d'abord restaurée avec un retour du seuil d'excitabilité au niveau normal au bout d'une vingtaine de jours. En revanche, les ondes du potentiel d'action composé ne réapparaissent qu'après soixante jours [50]. Une récupération comparable est observée chez le pigeon, chez lequel les décharges des afférences primaires retournent à la normale une centaine de jours après la lésion [51]. Ceci suggère une reconnexion synaptique

fonctionnelle entre les CC et les neurones du ganglion vestibulaire.

Chez le poulet, la fonction vestibulaire est également recouverte à un niveau supérieur d'intégration. Les réflexes vestibulo-oculaire et vestibulo-nuqual sont restaurés plusieurs semaines après leur disparition induite par la destruction des CC [52, 53]. Le premier réflexe correspond à des mouvements oculaires qui compensent les mouvements de la tête, afin d'assurer la stabilité de la vision; le second réflexe permet de stabiliser la tête lorsque le corps bouge. L'amplitude des mouvements compensateurs serait un indice de l'efficacité des CC. Cependant, ces réflexes font intervenir l'ensemble du réseau véhiculant l'information vestibulaire jusqu'au cerveau, ainsi que les afférences visuelles et somesthésiques. Aussi, la réapparition des deux réflexes est difficile à interpréter uniquement en terme de récupération fonctionnelle des CC, puisque des compensations centrales peuvent intervenir.

Quoi qu'il en soit, l'ensemble de ces résultats montre que le vestibulaire aviaire redevient fonctionnel régénérant les CC. Chez les mammifères, à la suite de la perte des CC, une restauration physiologique semble possible, mais uniquement par administration d'un cocktail de facteurs trophiques. Dans ce cas, le réflexe vestibulo-oculaire est recouvert en une centaine de jours [54].

Conclusions

La mise en évidence des cascades moléculaires et des mitogènes impliqués dans la régénération des cellules sensorielles vestibulaires ouvre la voie à des approches thérapeutiques, permettant la reconstitution des épithéliums de l'oreille interne provoquées par des lésions pathologiques ou ototoxiques. Cependant, la perte des informations vestibulaires périphériques peut être largement suppléée par une compensation d'origine centrale, alors que la destruction de l'épithélium cochléaire est, pour l'instant, irréversible et entraîne des déficits auditifs incurables. L'intérêt majeur des avancées concernant les épithéliums vestibulaires réside donc davantage dans la possibilité de définir des stratégies de recherche, visant à lever le frein qui

Remerciements

Nous remercions le Dr. M.T. Nicolas pour ses commentaires constructifs sur le manuscrit et M. B. Arnaud pour son aide à la réalisation de l'icongraphie.

s'oppose à la régénération des cellules sensorielles auditives ■

RÉFÉRENCES

1. Malgrange B, Lefebvre PP, Moonen G. Biologie cellulaire de la prévention et du traitement des surdités neurosensorielles. *Med/Sci* 1998; 14: 588-594
2. Sans A, Chat M. Analysis of temporal and spatial patterns of rat vestibular hair cell differentiation by tritiated thymidine radioautography. *J Comp Neurol* 1982; 206: 1-8.
3. Meza G, Lopez I, Paredes MA, Penaloza Y, Poblano A. Cellular target of streptomycin in the internal ear. *Acta Otolaryngol* 1989; 107: 406-11.
4. Llorens J, Demêmes D, Sans A. The behavioral syndrome caused by 3,3'-iminodipropionitrile and related nitriles in the rat is associated with the degeneration of the vestibular hair cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 123: 199-210.
5. Gleeson M, Felix H. A comparative study of the effect of age on the human cochlear and vestibular neuroepithelia. *Acta Otolaryngol* 1987 (suppl 436): 103-9.
6. Sans A, Bartolami S, Fraysse B. Histopathology of the peripheral vestibular system in small vestibular schwannomas. *Am J Otol* 1996; 17: 326-34.
7. Jorgensen JM, Mathiesen C. The avian inner ear. Continuous production of hair cells in the vestibular sensory organs, but not in the auditory papilla. *Naturwissenschaften* 1988; 75: 319-20.
8. Roberson DF, Weisleder P, Bohrer PS, Rubel EW. Ongoing production of sensory cells in the vestibular epithelium of the chick. *Hear Res* 1992; 57: 166-74.
9. Weisleder P, Rubel EW. Hair cell regeneration after streptomycin toxicity in the avian vestibular epithelium. *J Comp Neurol* 1993; 331: 97-100.
10. Corwin JT, Cotanche DA. Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science* 1988; 240: 1772-4.
11. Ryals BM, Rubel EW. Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult *Coturnix* quail. *Science* 1988; 240: 1774-6.
12. Hashino E, Sokabe M, Tanaka Y. Function-structure correlation during recovery from aminoglycoside ototoxicity in the avian auditory system. In: Dancer A, Henderson D, Salvi RJ, Hamernik RP ed. Noise induced hearing loss. St-Louis: Mosby Year Book 1992: 228-36.
13. Lenoir M, Vago P. Does the organ of Corti attempt to differentiate new hair cells after antibiotic intoxication in rat pups? *Int J Devel Neurosci* 1997; 15: 487-95.
14. Kil J, Warchol ME, Corwin JT. Cell death, cell proliferation and estimates of hair cell life spans in the vestibular organs of chicks. *Hear Res* 1997; 114: 117-26.
15. Warchol ME. Supporting cells in isolated sensory epithelia of avian utricles proliferate in serum free culture. *NeuroReport* 1995; 6: 981-4.
16. Oesterle EC, Tsue TT, Reh TA, Rubel E. Hair cell regeneration in organ cultures of the postnatal chicken inner ear. *Hear Res* 1993; 70: 85-108.
17. Tsue TT, Watling DL, Weisleder P, Coltrera MD, Rubel EW. Identification of hair cell progenitor and intermitotic migration of their nuclei in the normal and regenerating avian inner ear. *J Neurosci* 1994; 14: 140-52.
18. Forge A, Corwin JT, Nevill G. Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear. *Science* 1993; 259: 1616-9.
19. Warchol ME, Lambert PR, Goldstein BJ, Forge A, Corwin JT. Regenerative proliferation in inner ear sensory epithelia from adult guinea pigs and humans. *Science* 1993; 259: 1619-22.
20. Forge A, Li L, Nevill G. Hair cell recovery in the vestibular sensory epithelia of mature guinea pigs. *J Comp Neurol* 1998; 397: 69-88.
21. Tanyeri H, Lopez I, Honrubia V. Histological evidence for hair cell regeneration after ototoxic cell destruction with local application of gentamicin in the chinchilla crista ampullaris. *Hear Res* 1995; 89: 194-202.
22. Lopez I, Honrubia V, Lee SC, Schoeman G, Beykirch K. Quantification of the process of hair cell loss and recovery in the chinchilla crista ampullaris after gentamicin treatment. *Int J Devel Neurosci* 1997; 15: 447-61.
23. Tsue TT, Oesterle EC, Rubel EW. Diffusible factors regulate hair cell regeneration in the avian inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1584-8.
24. Zheng JL, Helbig C, Gao WQ. Induction of cell proliferation by fibroblast and insulin like growth factors in pure rat inner ear epithelial cell cultures. *J Neurosci* 1997; 17: 216-26.
25. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ *et al*. p27^{Kip1}, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8: 9-22.
26. Chen P, Segil N. p27^{Kip1} links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Development* 1999; 126: 1581-90.
27. Oesterle EC, Tsue TT, Rubel EW. Induction of cell proliferation in avian inner ear sensory epithelia by insulin like growth factor I and insulin. *J Comp Neurol* 1997; 380: 262-74.
28. Gu R, Yang JB, Magal E, Carnahan J. Neu-differentiation factor enhances cell proliferation in epithelium culture from rat utricle. *Assoc Res Otolaryngol* 1999; 22: 131.
29. Montcouquiol M, Karimi K, Corwin JT. Forskoline attenuates cell proliferation stimulated by glial growth factor 2 in mammalian vestibular sensory epithelia. *Mol Biol Hear Deafness* 1998; 3: 182.
30. Gu R, Marchionni M, Corwin JT. Age related decreases in proliferation within isolated mammalian vestibular epithelia cultured in control and glial growth factor 2 media. *Assoc Res Otolaryngol* 1997; 20: 390.
31. Yamashita H, Oesterle EC. Induction of cell proliferation in mammalian inner ear sensory epithelia by transforming growth factor α and epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3152-5.
32. Kuntz AL, Oesterle EC. Transforming growth factor α with insulin stimulates cell proliferation in adult rat vestibular sensory epithelium. *J Comp Neurol* 1998; 399: 413-23.
33. Montcouquiol M, Valat J, Travo C, Sans A. Short term responses of postnatal rat vestibular neurons following BDNF or NT3 application. *J Neurosci Res* 1997; 50: 443-9.
34. Saffer LD, Gu R, Corwin JT. An RT-PCR analysis for growth factor receptors in damaged and control sensory epithelia of rat utricles. *Hear Res* 1996; 94: 14-23.
35. Montcouquiol M, Karimi K, Corwin JT. Identification of intracellular signaling pathways responsible for cell proliferation in postnatal rat utricles. *Mol Biol Hear Deafness* 1998; 3: 140.
36. Kruger RP, Goodyear RJ, Legan PK, *et al*. The supporting-cell antigen: a receptor-like protein tyrosine phosphatase expressed in the sensory epithelia of the avian inner ear. *J Neurosci* 1999; 19: 4815-27.
37. Stone JS, Rubel EW. Delta 1 expression during avian hair cell regeneration. *Development* 1999; 126: 961-73.
38. Weisleder P, Tsue TT, Rubel EW. Hair cell replacement in avian vestibular epithelium: supporting to type I hair cell. *Hear Res* 1995; 82: 125-33.
39. Dye BJ, Frank TC, Newland SD, Dickman JD. Distribution and time course of hair cell regeneration in the pigeon utricle. *Hear Res* 1999; 133: 17-26.
40. Montcouquiol M, Valat J, Travo C, Sans A. A role for BDNF in early postnatal rat vestibular epithelia maturation: implication of supporting cells. *Eur J Neurosci* 1997; 10: 598-606.
41. Masetto S, Correia MJ. Ionic currents in regenerating avian vestibular hair cells. *Int J Devel Neurosci* 1997; 15: 387-99.
42. Rüschi A, Lysakowski A, Eatock RA. Postnatal development of type I and type II hair cells in the mouse utricle: acquisition of voltage-gated conductances and differentiated morphology. *J Neurosci* 1998; 18: 7487-501.

43. Favre D, Sans A. Dedifferentiation phenomena after denervation of mammalian adult vestibular receptors. *NeuroReport* 1991; 2: 501-4.

RÉFÉRENCES

44. Baird RA, Steyger PS, Schuff NR. Mitotic and nonmitotic hair cell regeneration in the bullfrog vestibular otolith organs. *Annals NY Acad Sci* 1996; 781: 59-70.

45. Steyger PS, Burton M, Hawkins JR, Schuff NR, Baird RA. Calbindin and parvalbumin are early markers of non-mitotically regenerating hair cells in the bullfrog vestibular otolith organs. *Int J Devl Neurosci* 1997; 15: 417-32.

46. Rubel EW, Dew LA, Roberson DW. Mammalian vestibular hair cell regeneration. *Science* 1995; 267: 701-3.

47. Li L, Forge A. Morphological evidence for supporting cell to hair cell conversion in the mammalian utricular macula. *Int J Devl Neurosci* 1997; 15: 433-46.

48. Gale JE, Meyers JR, Corwin JT. Replacement of the transduction apparatus in damaged bullfrog sacculus. *Mol Biol Hear Deafness* 1998; 3: 183.

49. Zheng JL, Keller G, Gao WQ. Immunocytochemical and morphological evidence for intracellular self-repair as an important contributor to mammalian hair cell recovery. *J Neurosci* 1999; 19: 2161-70.

50. Jones TA, Nelson RC. Recovery of vestibular function following hair cell destruction by streptomycin. *Hear Res* 1992; 62: 181-6.

51. Li W, Corriera MJ. Recovery of semicircular canal primary afferent activity in the pigeon after streptomycin ototoxicity. *J Neurophysiol* 1998; 80: 3297-311.

52. Carey JP, Fuchs AF, Rubel EW. Hair cell regeneration and recovery of the vestibuloocular reflex in the avian vestibular system. *J Neurophysiol* 1996; 76: 3301-12.

53. Goode CT, Carey JP, Fuchs AF, Rubel EW. Recovery of the vestibulocolic reflex after aminoglycoside ototoxicity in domestic chickens. *J Neurophysiol* 1999; 81: 1025-35.

54. Kerkut DR, GLOSSAIRE, Hef

Aminoglycosides : Antibiotiques, tels que gentamicine et streptomycine, cytotoxiques pour les cellules sensorielles de l'oreille interne.

BrdU : 5 bromo 2 déoxyuridine. S'incorpore dans l'ADN lors de la phase S, et permet de détecter les cellules en prolifération.

CC : cellules ciliées sensorielles de l'oreille interne.

CC1 : cellules ciliées vestibulaires de type 1.

CC2 : cellules ciliées vestibulaires de type 2.

Cochlée : organe-récepteur auditif spécifique de l'oreille interne des mammifères.

CS : cellules de soutien entourant les cellules ciliées.

Forskoline : active directement l'adénylate cyclase qui élève la concentration intracellulaire en AMPc.

Kinases S6 : kinases ribosomales, activées en particulier par la voie de transduction de la phosphatidylinositol-3-kinase.

Organe de Corti : épithélium neurosensoriel auditif des mammifères, présent dans la cochlée.

Papille basilaire : épithélium neurosensoriel auditif des oiseaux, son organisation tissulaire générale est comparable à celles du saccule et de l'utricule vestibulaires.

TrkB : principal récepteur tyrosine-kinase du brain derived neurotrophic factor.

TrkC : principal récepteur tyrosine-kinase de la neurotrophine 3.

Summary

Postlesional regeneration of vestibular hair cells in adult animals

In mammals, the destruction of mature hair cells (HCs) of the inner ear produces balance disorders and irreversible deafness. Since both avian and mammalian HCs were believed to be produced prior to birth, HC regeneration was not thought to occur. However, during the last decade, research has indicated that vestibular HCs can reappear after lesions of the neurosensory epithelia, whereas cochlear HCs do not regenerate. Repair of the neurosensory epithelium is associated with division of epithelial supporting cells. *In vitro*, this proliferation is stimulated by growth factors acting on tyrosine kinase receptors, but the effect of each growth factor varies depending on the maturation stage and on the species. New HCs may arise either from differentiation of proliferating cells or from transdifferentiation of differentiated supporting cells. The differentiation process can affect two subsets of HCs (type 1 and type 2 HC) which differ in their regenerating potential, since one can become physiologically mature, while the other will display immature physiological features.

TIRÉS À PART

S. Bartolami.