

# L'inhibition de prolifération des cellules de l'environnement neuronal diminue la survie des souris dans un modèle de Sclérose Latérale Amyotrophique

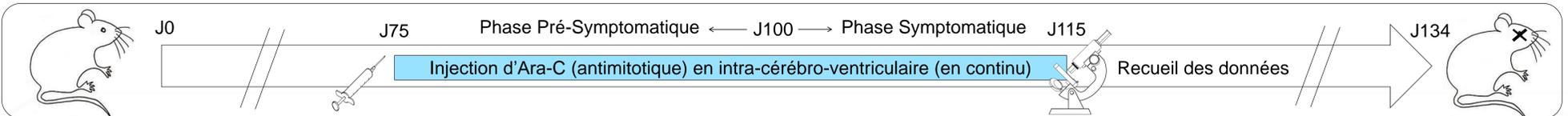
## INTRODUCTION

La SLA est une maladie de l'adulte, actuellement sans traitement, caractérisée par la mort des motoneurones et une neuro-inflammation qui pourrait soit aggraver soit limiter les processus. Il est décrit notamment une activation et une prolifération microgliale. Dans 10% des cas, il existe une origine génétique à cette pathologie. La mutation la plus fréquemment décrite est la mutation G93A de la Super Oxyde Dismutase 1 (SOD1). Chez la souris, la surexpression du gène humain muté de la SOD1 induit une paralysie qui commence à 100 jours dont l'évolution mime celle de la pathologie humaine. Dans ce modèle, il existe une prolifération cellulaire, portant essentiellement sur la microglie.

## OBJECTIF de l'article : Evaluer les conséquences de l'ablation des cellules prolifératives de l'environnement neuronal dans le modèle murin de SLA

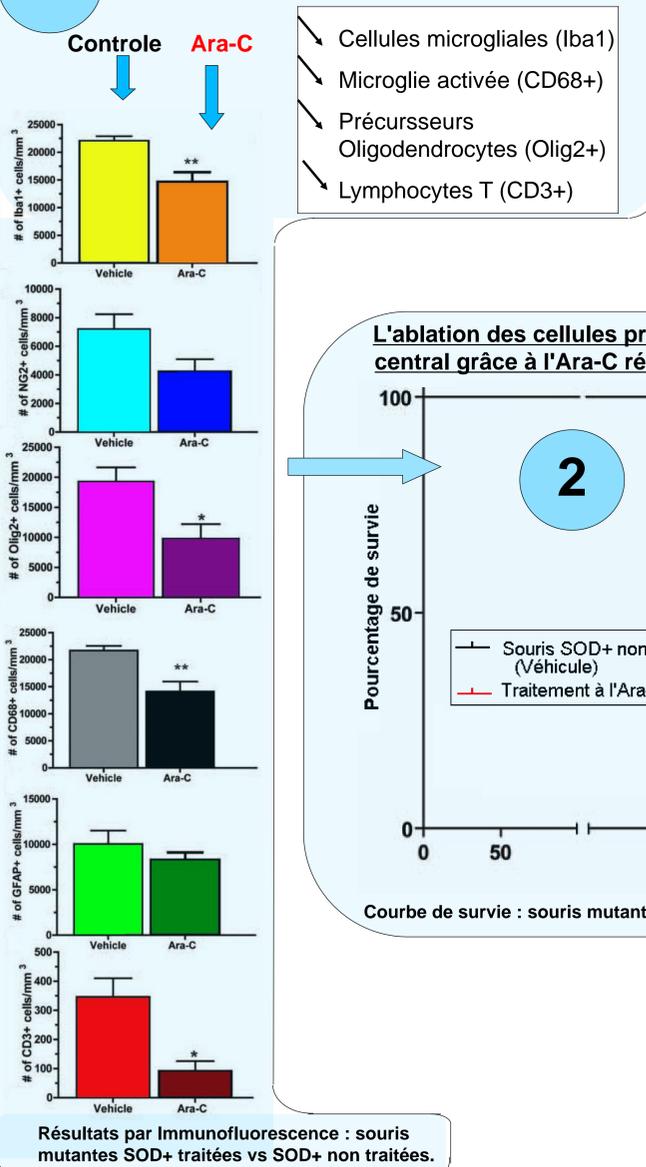
- Analyse de l'effet de l'Ara-C sur :
- 1. la prolifération des cellules de l'environnement moto-neuronal
  - 2. la survie des souris mutantes (SOD+)
  - 3. la dégénérescence des motoneurones et dénervation
  - 4. l'expression de facteurs inflammatoires et neuroprotecteurs
- Immunohistochimie en fluorescence
  - Etude comportementale
  - Microscopie optique et immunohistochimie
  - RT-PCR quantitative

## STRATEGIE EXPERIMENTALE

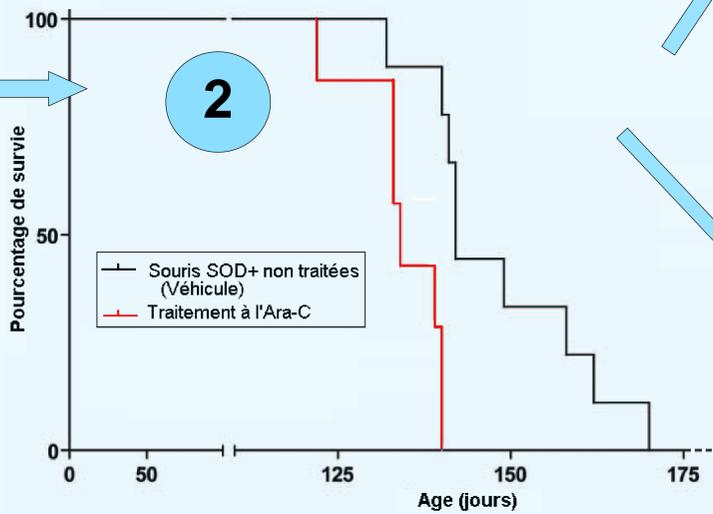


## RESULTATS

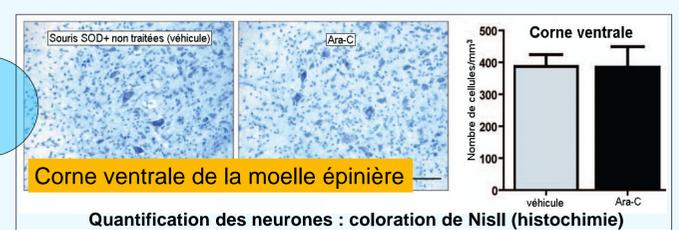
### 1 Déplétion des cellules prolifératives dans le SNC des souris mutantes SOD+ grâce à l'Ara-C



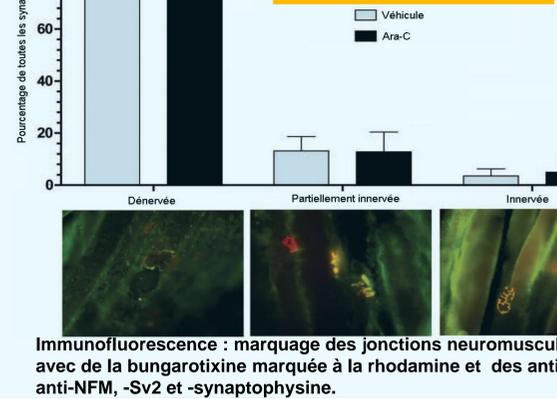
### L'ablation des cellules prolifératives dans le système nerveux central grâce à l'Ara-C réduit la durée de vie des souris SOD+



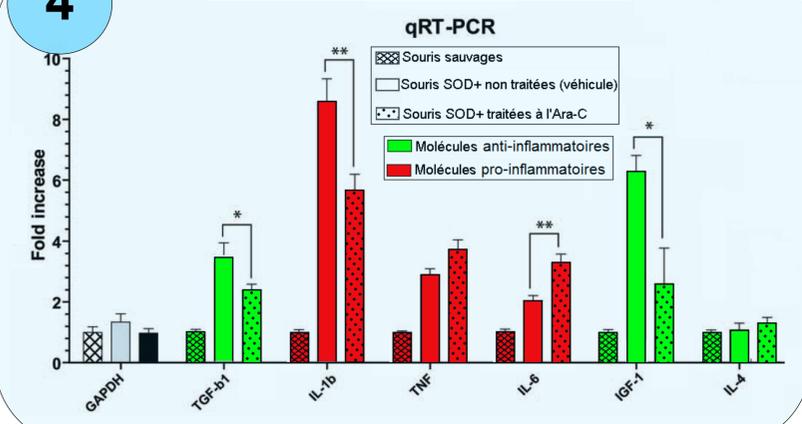
### 3 La perte neuronale et l'innervation ne sont affectées par le traitement à l'Ara-C



### Jonction neuromusculaire

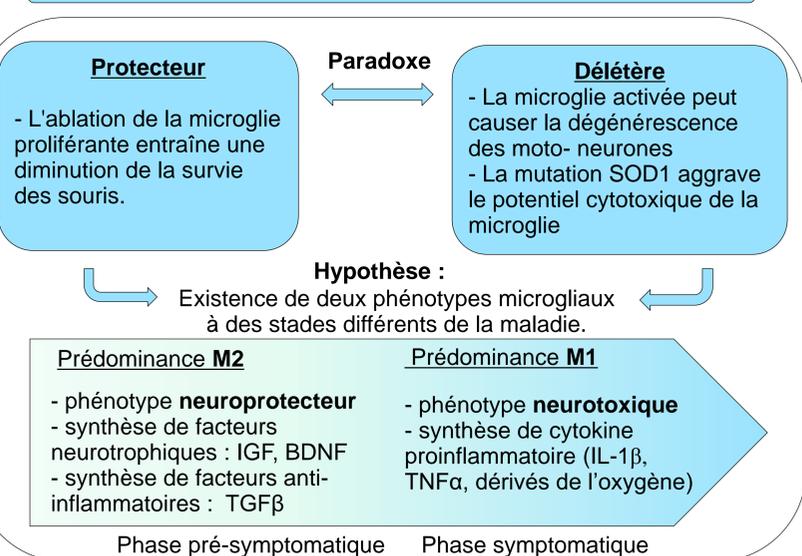


### 4 Modulation de la réponse inflammatoire chez les souris SOD+ et SOD+ traitées à l'Ara-C



## DISCUSSION GENERALE

### LE DOUBLE JEU DE LA MICROGLIE



### L'INTERET POUR L'HOMME DU MODELE MURIN SOD1

- Contre :**
- Pas d'effet concluant sur l'homme de molécules efficaces chez l'animal
  - Les mutations SOD1 ne représentent que 2% des patients SLA
  - Nécessité d'une expression de 15 copies du gène humain muté
  - La SLA n'existe pas chez la souris
- Pour :**
- Symptômes proches de ce qui se produit chez l'homme
  - Seul modèle de souris disponible
  - A permis de comprendre l'importance de l'interaction entre motoneurones/cellules gliales/cellules immunes
  - Difficulté d'analyser des hypothèses directement chez l'homme

### Que faire pour avancer dans la recherche ?

1. Connaître les limites des modèles murins et faire des essais directement sur l'homme
2. Effectuer des essais standardisés applicables à l'homme
3. Mettre au point de nouveaux modèles murins exprimant d'autres mutations
4. Découvrir des marqueurs biologiques fiables pour détecter la SLA plus tôt

# A la recherche d'un vecteur potentiellement applicable pour les pathologies neurologiques



RODRIGUES Cédric, ROSELLI Jérémy, SALINAS Nadia  
L3 médecine, faculté de la Timone Marseille, Master Neurosciences



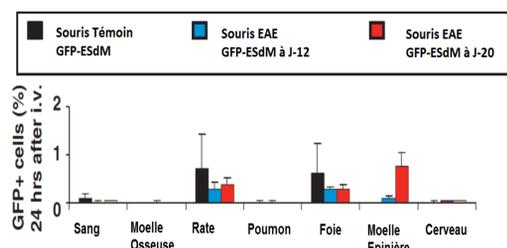
## Introduction:

Les caractéristiques de la barrière hémato-encéphalique (BHE) rendent difficile la thérapeutique médicamenteuse dans les maladies du système nerveux central (SNC). L'une des perspectives envisagées pour y remédier, résiderait en l'utilisation de cellules médicaments comme véhicule thérapeutique. L'objet de l'article est de tester l'efficacité des cellules microgliales dérivées de cellules souches embryonnaires (ESdM) dans un modèle de maladie neurodégénérative tel que l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE).

## Résultats

### A Migration des précurseurs microgliaux après transplantation IV dans les lésions inflammatoires de la moëlle épinière :

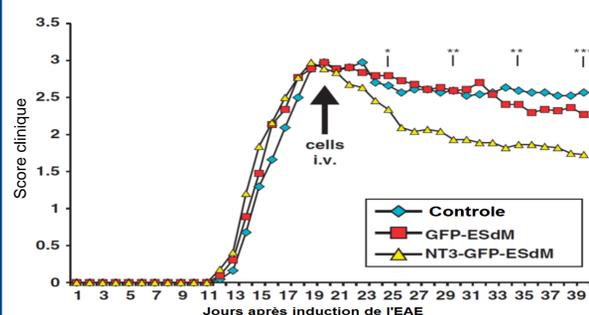
Le pourcentage des GFP-ESdM dans les différents organes est déterminé par quantification en cytométrie de flux après transplantation.



Les cellules GFP-ESdM migrent dans les lésions inflammatoires de la moëlle épinière.

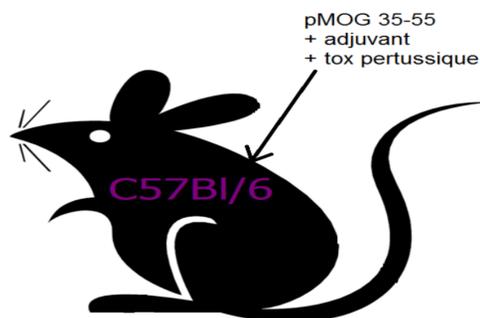
### B Evolution du score clinique dans l'EAE :

Injection i.v. de cellules NT3-GFP-ESdM dans un total de 22 souris EAE à J20 après l'induction de l'EAE.



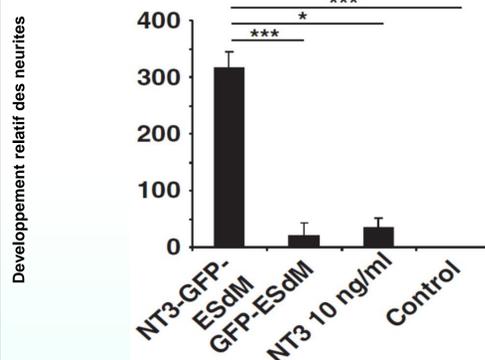
Le traitement en i.v. avec NT3-GFP-EsdM améliore significativement la pathologie.

### Modèle de l'EAE (encéphalomyélite auto-immune expérimentale)



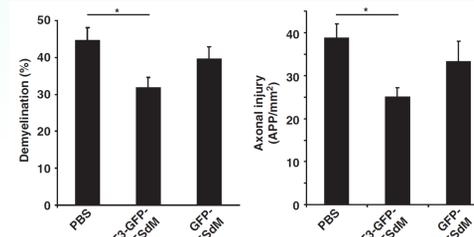
### E Effet des cellules NT3-ESdM sur la croissance des neurites :

Des neurones issus des ganglions spinaux provenant de souris au stade embryonnaire sont cultivés avec un surnageant de GFP-ESdM, NT3-GFP-ESdM ou de la NT3 recombinante.



Les cellules NT3-ESdM promeuvent la croissance neuritique

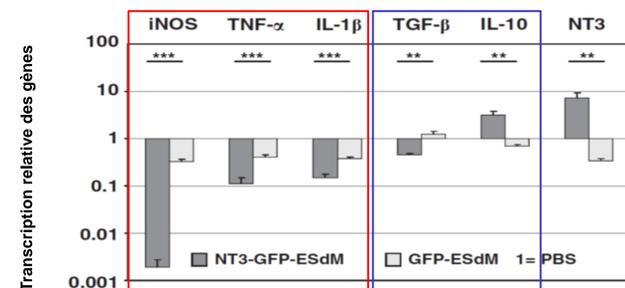
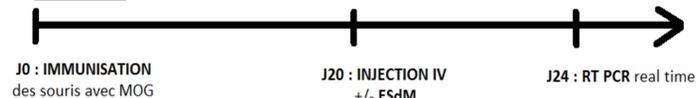
### C Quantification de la démyélinisation (marquage au luxol) et des lésions axonales (marquage de l'APP : précurseur du peptide amyloïde): (Analyse à J21 après traitement des souris EAE)



L'expression du NT3 par les ESdM réduit les processus de démyélinisation et l'intensité des lésions axonales.

### D Analyse en RT-qPCR de l'expression des gènes codant pour les médiateurs inflammatoires et anti-inflammatoires :

EXPERIENCE :



La NT3 modifie le milieu de cytokines en diminuant la transcription des marqueurs pro-inflammatoires et en augmentant celle d'un marqueur anti-inflammatoire.

## Conclusion:

Les cellules microgliales dérivées de cellules souches embryonnaires (ESdM) se sont révélées un transporteur cellulaire intéressant, utilisable dans un modèle de pathologie neurologique. Contrairement à d'autres vecteurs cellulaires, il existe une persistance de ses cellules dans l'environnement cérébral. L'application chez l'homme de cette stratégie utilisant des cellules ES humaines est limitée par le rejet immunitaire de cellules HLA incompatibles injectées par voie systémique. Une alternative serait l'utilisation de cellules IPS (induced pluripotent stem cells). Cependant, actuellement, l'analyse de ces cellules révèlent de nombreuses modifications génétiques induites *in vitro*.

## Bibliographie:

### Article présenté :

Beutner C, Lepperhof V, Dann A, Linnartz-Gerlach B, Litwak S, Napoli I, Prinz M, Neumann H. Engineered stem cell-derived microglia as therapeutic vehicle for experimental autoimmune encephalomyelitis. *Gene Ther.* 2013 Aug;20(8):797-806C.

### Autres références :

Beutner C, Roy K, Linnartz B, Napoli I, Neumann H. Generation of microglial cells from mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc.* 2010 Sep;5(9):1481-94.  
Payne N, Siatskas C, Barnard A, Bernard CC. The prospect of stem cells as multi-faceted purveyors of immune modulation, repair and regeneration in multiple sclerosis. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2011 Mar;6(1):50-62.  
Neumann H. Microglia: a cellular vehicle for CNS gene therapy. *J Clin Invest.* 2006 Nov;116(11):2857-60.

## Remerciements:

Aux professeurs du master neurosciences dont notre tuteur M. Boucraut.  
Aux auteurs de cet article C. Beutner et al.  
A la faculté de médecine de la Timone.

# Prenatal exposure to bisphenol A interferes with the

## development of cerebellar granule neurons in mice and chicken

Gro H. Mathisen, Mazyar Yazdani & al.



L3 médecine 2013-2014

MAIROT Kevin, NIDDAM Samuel, SAHAKIAN Nicolas  
SAIDI Chams-eddine, SCUSSEL Renaud

# Migration neuronale

www.valbiome.fr

Mots clés : Bisphénol A Grains du cervelet Pax6

www.univ-amu.fr

### Introduction

Le **bisphénol A (BPA)**, composé aromatique présent dans les matières plastiques et l'environnement, est susceptible d'entraîner des effets néfastes chez l'homme (notamment par son rôle connu de perturbateur endocrinien).

L'exposition prénatale de la souris au BPA perturbe la migration neuronale et donc l'histogenèse du néocortex<sup>1</sup>. Il en est de même dans le cortex cérébelleux où les acteurs moléculaires sont encore méconnus.

Pax6 est un facteur de régulation de la transcription fortement impliqué dans la différenciation<sup>2</sup> et la migration<sup>3</sup> des grains du cervelet.

L'objectif de l'étude était de montrer que **l'exposition prénatale au BPA affecte la morphologie cérébelleuse ainsi que le taux de pax6 dans les grains du cervelet.**

2 modèles ont été utilisés dans cette étude:

- une approche *in vivo* (souris) pour explorer les répercussions d'une exposition au BPA continue depuis un stade embryonnaire (SE) précoce.
- une approche *in vitro* par culture cellulaire de grains d'embryons de poulets (SE tardif) brièvement exposés au BPA.

De plus, l'effet dose-dépendant du BPA a été étudié.

### Matériel et méthodes

**Le Bisphénol A** (2,2-bis-(4-hydroxyphenyl)-propane) est un monomère issu de la production de polycarbonates. Il franchit les barrières hémato-encéphalique et placentaire.

**Modèle *in vivo***: deux souches différentes de souris : une BALB/cA et une non-diabétique NOD/shiLTJ. Elles sont exposées au BPA, avant l'accouplement puis sur toute la durée de la gestation et de l'allaitement. Les cervelets de la descendance des 2 lignées de souris ont été prélevés à différents jours post-nataux et analysés par Western blot et immunohistochimie. Le BPA est dissous dans l'eau de boisson à différentes concentrations. Il n'est pas présent dans l'eau des animaux contrôles.

**Modèle *in vitro***: les embryons de poulets reçoivent une injection unique de BPA (dissous dans l'éthanol) au 16ème jour embryonnaire. 24h après, les grains du cervelet sont prélevés, mis en culture puis analysés par Western blot et immunohistochimie. La concentration finale en BPA est de l'ordre de l'exposition environnementale de l'homme. Les animaux contrôles sont soit non-injectés, soit injectés avec de l'éthanol.

La loi Norvégienne en vigueur sur les expérimentation animales a été respectée.

#### immunohistochimie:

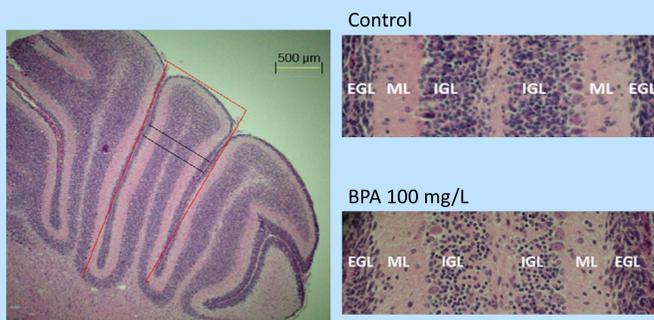
- 1) des coupes coronales de 30 µm ont été effectuées sur des cervelets de souris puis colorées à l'H&E. L'épaisseur de l'EGL (couche granulaire externe) a été mesurée (4 expériences indépendantes). Pax6 a été détecté par immunohistochimie.
- 2) Les grains des cervelets de poulets ont été fixés après 3 ou 6 jours de culture (Day In Vitro DIV3 et 6). Pax6 a été détecté par immunocytochimie, couplé à un marquage nucléaire de Hoechst.

**Western blot**: ils sont réalisés à partir d'un homogénat de grains de cervelet de souris et des cultures cellulaires. On détecte ensuite **pax6, PCNA et B-actine**.

### Résultats

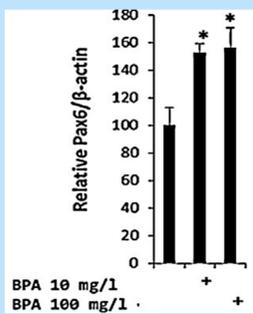
#### Chez la souris BALB/cA exposée au BPA à j11

##### I. Analyse de la morphologie cérébelleuse



1. La couche granulaire externe (EGL) est épaissie : augmentation du nombre de grains
2. La couche granulaire interne (IGL) et la couche moléculaire (ML) ne sont pas modifiées.

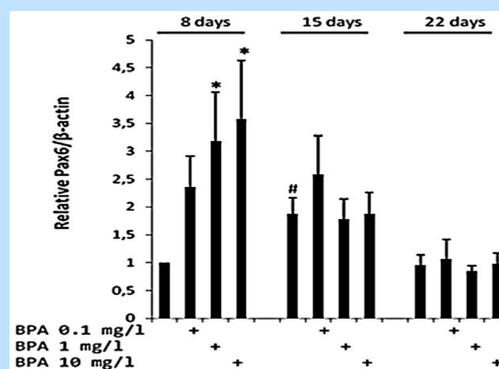
##### II. Exploration de l'effet du BPA sur Pax6



Le taux de pax6 augmente de manière significative et de façon dose-dépendante après exposition au BPA.

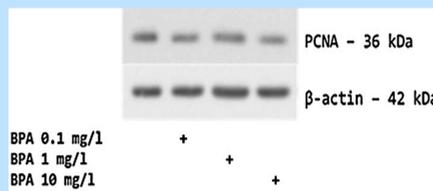
#### Chez la souris NOD exposée au BPA

##### I. Taux de Pax6 analysé à différents moments du développement



1. Augmentation significative du taux de pax6 à J8.
2. Pas de modification à J15 et J22.

##### II. Relation entre BPA et mitose

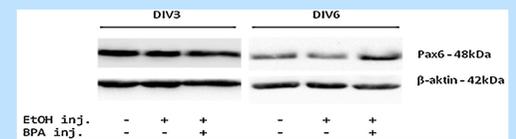


Pas de modification de l'expression du PCNA (Prolifering Cell Nuclear Antigen) suite à l'exposition au BPA.

Le BPA n'agit pas sur la prolifération cellulaire mais entraîne une accumulation des grains dans l'EGL par blocage de leur migration vers l'IGL.

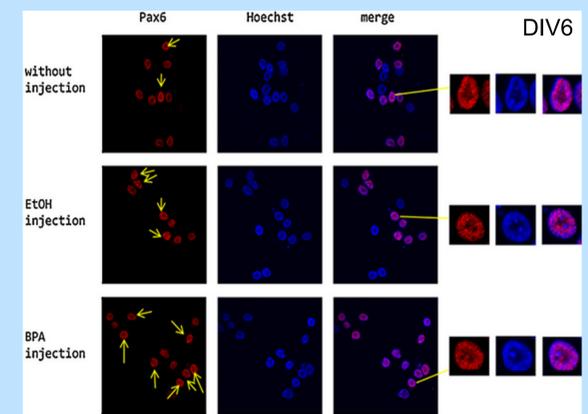
#### Chez l'embryon de poulet exposé au BPA

##### I. Taux de Pax6 analysé par Western Blot



1. Pas d'effet du BPA sur l'expression de pax6 à DIV3.
2. Le BPA provoque une augmentation significative de l'expression de pax6 à DIV6.

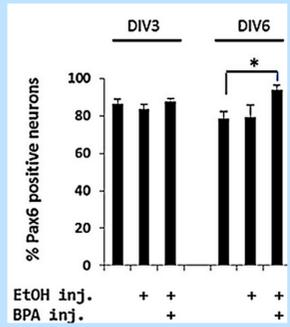
##### II. Étude des neurones exprimant pax6



Augmentation du nombre de cellules pax6 positives à DIV6 par rapport aux contrôles.

Le BPA engendre donc une augmentation :

1. du nombre de cellules pax6 positives
2. du taux de pax6 intracellulaire.



### Conclusion

L'exposition prénatale au BPA s'accompagne :

- d'une augmentation de l'épaisseur de l'EGL (souris BALB/cA).
- d'une augmentation du taux de pax6, retrouvée dans les 2 modèles (*in vivo* et *in vitro*)
- d'un retard de migration causant une accumulation des grains (souris non diabétique NOD).
- d'une augmentation du nombre de grains exprimant pax6 (embryons de poulets).

Les résultats ont montré que l'impact du BPA dépend de la dose administrée, de la durée et du moment d'exposition (notion de période critique).

Ces modèles sont intéressants pour explorer les effets du BPA sur l'embryogenèse humaine puisque sa pharmacocinétique est similaire chez l'homme et la souris. Les doses utilisées miment l'exposition humaine au BPA, rendant cette étude pertinente et permettant d'apporter un élément de réponse quant à sa nocivité.

De nouvelles mesures ont été prises pour exclure le BPA des matières plastiques auxquelles nous sommes exposés.

### Bibliographie

1. Nakamura & al, 2006. Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure of low doses of bisphenol A. J. Neurosci. Res. 84, 1197-1205.
2. Swanson & al, 2005. Disruption of cerebellar granule cell development in the pax6 mutant. Brain Res. Dev. 160, 176-193.
3. Yamasaki & al, 2001. Pax6 regulates granule cell polarization during parallel fiber formation in the developing cerebellum. Development 128, 3133-3144.
- Rakic P, 1971. Neuron-glia relationship during granule cell migration and developing cerebellar cortex. J. Comp. Neurol. 141,283-312.
- Hatten and Heintz, 1995. Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. Annu. Rev. Neurosci. 18, 385-408.
- Steinmetz & al, 1997. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo. Endocrinology 138, 1780-1786.
- Engelkamp & al, 1999. Role of pax6 in development of the cerebellar system. Development 126, 3585-3596.
- Ikezuki & al, 2002. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. Hum. Reprod. 17, 2839-2841.
- Kim & al, 2004. Distribution of bisphenol A in the neuroendocrine organs of female rats. Toxicol. Ind. Health 20,41-50.
- Yamamoto & al, 2007. Monitoring of gene expression in the differentiation of embryoid bodies from cynomolgus monkey embryonic stem cells in the presence of bisphenol A. J. Toxicol. Sci. 32, 301-301.
- Baba & al, 2009. Bisphenol A disrupts Notch signaling by inhibiting gamma-secretase activity and causes eye dysplasia of Xenopus laevis. Toxicol. Sci. 108, 344-355.

**Remerciement:** Nous remercions Madame le professeur Auttillo-Touati Amapola pour son aide précieuse et son investissement dans ce poster.

# L'acouphène: le bruit du silence

Clémence Canivet, Bérangère Démarez, Julien Lacheray, Morgane Petit, Jean-Baptiste de Villeneuve Bargemon.

L3 Médecine

Stimulation du nerf vague  
**Sensorialité**



www.univ-amu.fr

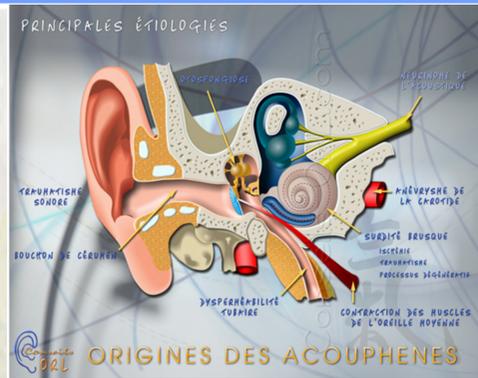


## Introduction

- Les acouphènes se caractérisent par une perception subjective d'un son en l'absence de stimulations acoustiques extérieures.
- Véritable problème de santé publique: 10% de la population française concernée.
- Qualité de vie: sur 603 personnes souffrant d'acouphènes, dans 26% des cas l'acouphène a créé des difficultés dans la vie quotidienne.
- Etiologies (traumatisme sonore connu pour être à l'origine de nombreux cas d'acouphènes)

**Problématique:** Par quel moyen thérapeutique pouvons-nous réorganiser la carte corticale et potentiellement supprimer les acouphènes?

**Hypothèse:** La VNS a déjà fait ses preuves dans le traitement de l'épilepsie et des troubles dépressifs chez l'Homme en induisant une réorganisation de la carte corticale chez ces patients. Cette technique pourrait également être appliquée pour réverser l'activité neuronale pathologique chez les patients acouphéniques.



## Expérience 1: Mettre en évidence des remaniements de la carte corticale secondaires à la VNS + son

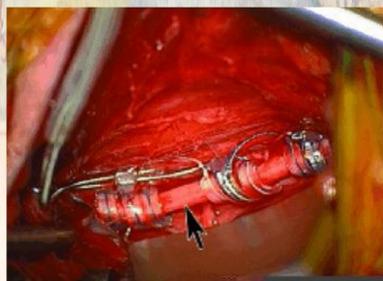
### Protocole Chirurgical

#### Dispositif implanté:

- Sonde avec 3 hélices dont 2 électrodes bipolaires + 1 hélice de stabilisation + branche de connection sur le générateur d'impulsion
- Position sous-cutanée du dispositif
- Générateur en position sous-claviculaire

#### Stimulation du nerf vague (X):

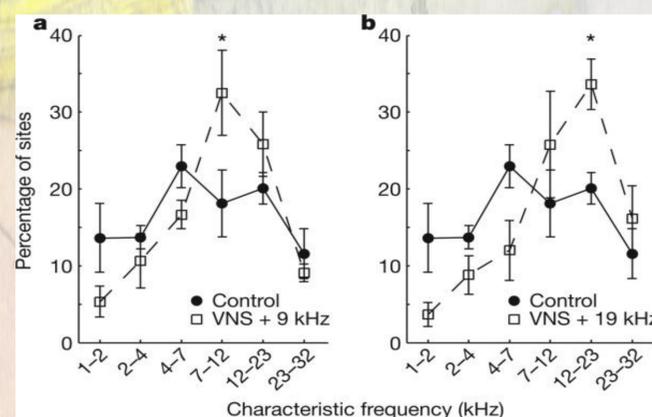
- Implantation d'une électrode bipolaire au niveau du nerf vague gauche de l'animal sous anesthésie générale
- Stimulations électriques brèves et répétées (courant alternatif)
- Pourquoi le nerf vague?
- Action synergique de multiples neuromodulateurs agissant dans le cortex cérébral (apprentissage et mémoire +++).



### Méthodologies

- 13 rats non anesthésiés normo-entendants **sans acouphène**;
- VNS associée à un son de 9kHz (60 dB SPL) pour 8 rats;
- VNS associée à un son de 19 kHz (50 dB SPL) pour 5 rats;
- Durée VNS= 0,5 sec, intensité= 0,8 mA;
- Vis à os utilisées pour enregistrer les réponses auditives du tronc cérébral (PEA) et EEG;
- 300 fois par jour pendant 20 jours, séance de 2,5h;
- 24h après la dernière séance d'appariement VNS/son : techniques de cartographie standard.

### Résultats



Augmentation de 20% du nombre de sites de cortex auditifs primaires ayant une caractéristique de fréquence proche de la fréquence de la tonalité appariée.

#### Paramètres du traumatisme acoustique:

- 28 rats anesthésiés, exposés à un son de 16kHz, 115dB SPL, pendant 1h;
- Exposition bilatérale (=exposition chez l'Homme);
- Perte auditive quantifiée par PEA.

## Expérience 2: Startle Response & Gap Detection

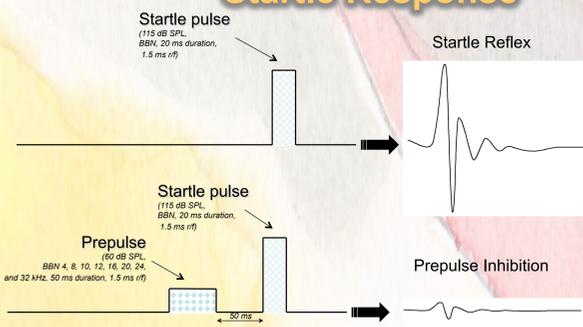
Comment déterminer la présence d'acouphènes sur une population de rats normo-entendants après un traumatisme acoustique?

#### Paramètres de l'expérience:

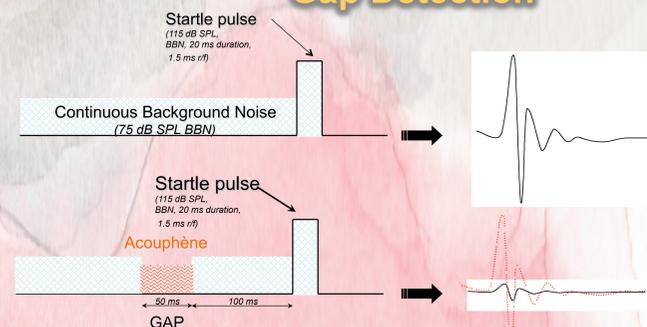
- Cage garnie de mousse acoustique;
- Plate-forme de sursaut + transducteur piézo-électrique (enregistrement continu de la force);
- Haut-parleur 20 cm au-dessus de la cage;



### Startle Response



### Gap Detection



**Résultat:** Le prepulse survenu 50 ms avant le bruit fort surprenant a réduit l'amplitude du sursaut réflexe.

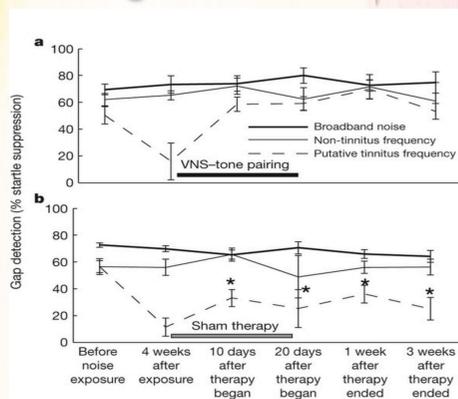
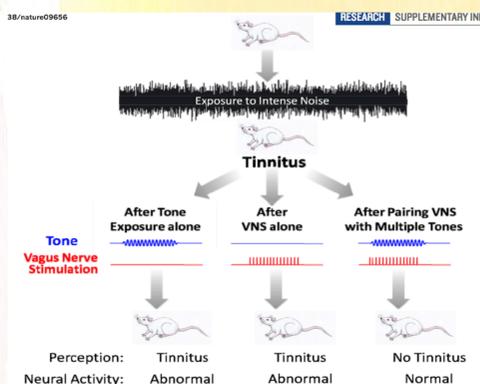
**Résultat:** De même, un intervalle (GAP) de 50 ms de silence au sein du bruit continu aura le même effet que le prepulse ; il agit comme un avertissement et réduit l'amplitude du sursaut. Dans le cas d'un acouphène, l'intervalle de silence ne sert pas d'avertissement – car les acouphènes perçus comblent l'espace silencieux – et l'amplitude du sursaut n'est pas diminuée.

## Expérience 3: Mettre en évidence l'efficacité de la thérapie VNS+sons dans le traitement de l'acouphène.

Sur 7 rats acouphéniques:

- VNS + sons purs qui couvrent la gamme de l'audition du rat mais excluent les fréquences surreprésentées;
- Brèves stimulations de VNS: 30 sec toutes les 5 min, 24h par jour;

9 rats acouphéniques vont subir une thérapie factice (sons sans VNS, VNS sans sons ou pas de traitement).



Après 10 jours de traitement, chacun des 7 rats a montré une réduction significative du sursaut. Les effets sont maintenus 3 semaines après.

Chacun des 9 rats ayant reçu une thérapie factice montre une incapacité à détecter l'intervalle silencieux dans la fréquence de l'acouphène.

## Discussions

- Quels effets secondaires? - Thérapie efficace sur le long terme? Même après 3 semaines? - Est-ce que des bloqueurs des voies cholinergiques bloquent la réorganisation du cortex? - Pourquoi on utilise le trauma acoustique? Quelle autre méthode, peut être moins compliquée, pour induire des acouphènes? - Comment traiter les patients sourds qui n'entendent pas les sons de la stimulation? - Comment augmenter le rapport bénéfices/risques pour l'appliquer à la nouvelle génération d'acouphéniques exposée quotidiennement à des traumatismes sonores (baladeur, discothèque, etc.)?

Sources de l'iconographie et références bibliographiques

1) Engineer et al., 2011 N.D. Engineer, J.R. Riley, J.D. Seale, W.A. Vrana, J.A. Shetake, S.P. Sudhanagunta, M.S. Borland, M.P. Kilgard Reversing pathological neural activity using targeted plasticity Nature, 470 (2011), pp. 101–104  
2) Turner et al., Behavioral Neuroscience (2006)  
3) Nicolas-puel C, Akbaraly T, Lloyd R, Berr C, Uziel A, Rebillard G, et al. Characteristics of Tinnitus in a Population of 555 Patients: Specificities of Tinnitus Induced by Noise Trauma. Int Tinnitus J. 2006;12(1):64-70

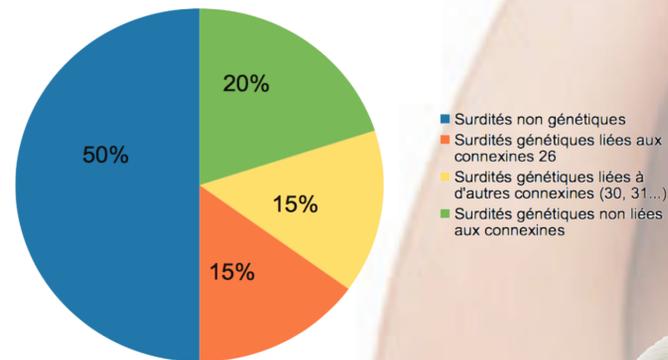
# La connexine 30 : une avancée pour la recherche et un grand pas pour le traitement des surdités génétiques

Sensorialité

ALLARD C., BAQUÉ E., DELENNE S., HANVIC B., OHRESSER M.

## Introduction

La surdité touche 1,2 à 1,7 nouveaux nés pour 1000 naissances. Elle est due le plus souvent à une perte de fonction de la cochlée. Dans 50% des cas, cette surdité est génétique, dont 30% découlent d'une mutation **autosomique récessive** du gène codant pour la connexine (Le nerf auditif lui est fonctionnel).

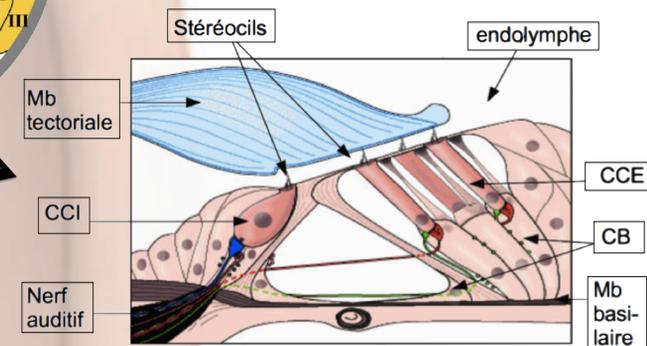
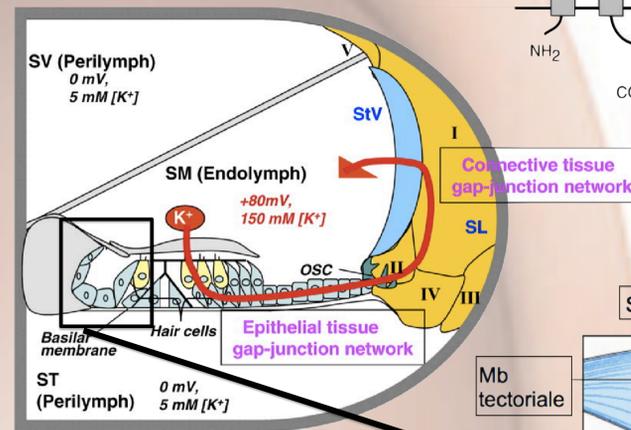
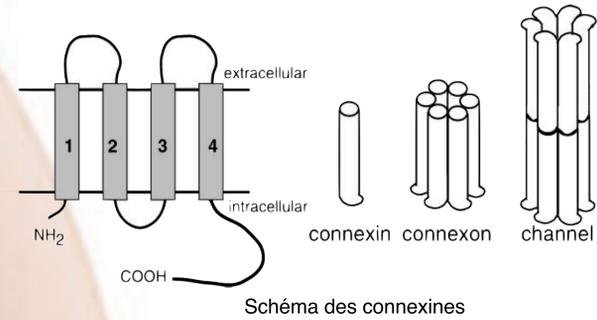


**Protocole:** manipulation sur embryons de souris in vivo à 11,5 jours.

**Méthodes:** transfection du gène de la CX30 grâce à EUGO (électroporation) sur souris modifiées par la technique des ShRNA (petits ARN interférents).



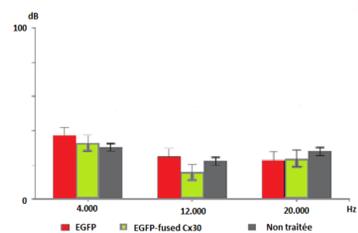
Les connexines impliquées dans l'audition sont les connexines Cx30 et Cx26. Celles-ci permettent de réaliser le **cycle du potassium**.



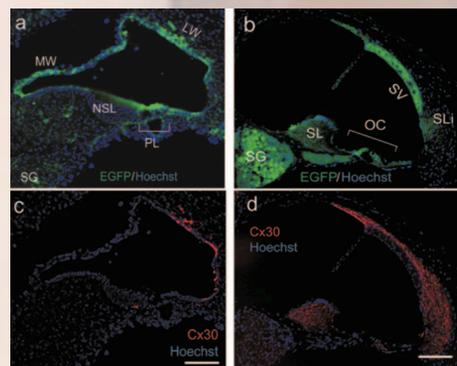
## Résultats

### 1 Faisabilité de la technique et exploration fonctionnelle

Souris traitées avec EGFP, EGFP-fused Cx30 (Cx non efficace), et souris témoins.

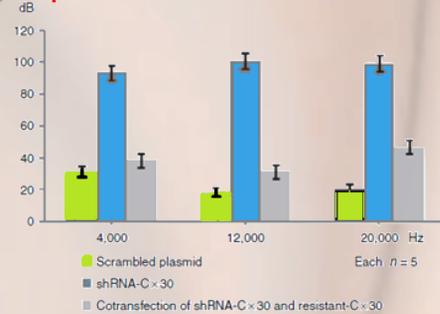


Implantation solide du transgène, sans modification du seuil d'audition.



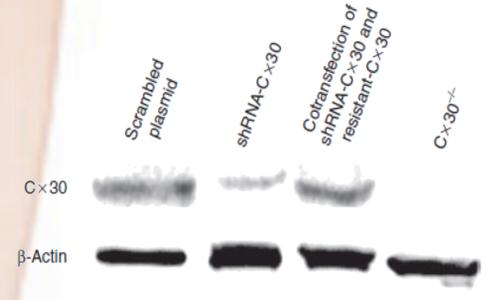
La distribution d'EGFP et de la Cx30 endogène sont corrélées: utilisation d'EGFP-Cx30 thérapeutique (=efficace) envisageable.

### 3 La cotransfection du shRNA-Cx30 et du gène sauvage Cx30 annule la sous expression et restaure la fonction auditive



**Seuil d'audition (dB) en fonction des plasmides transfectés :**

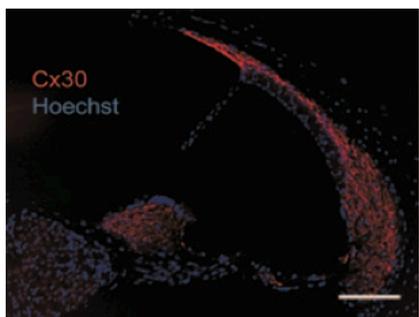
- scrambled (témoin)
- shRNA-Cx30: downrégulation
- Gène sauvage + shRNA : fonction restaurée



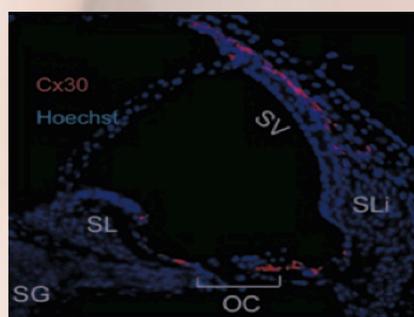
**Western Blot :**

- Diminution de l'expression de la CX30 lorsqu'on transfecte shRNA-Cx30 seul.
- Restauration du niveau d'expression lorsqu'on ajoute le gène sauvage.

### 2 On transfecte ShRNA-Cx30 par EUGO dans une cochlée de souris pour constater la sous expression des Cx30 endogènes due à ce ShRNA transfecté

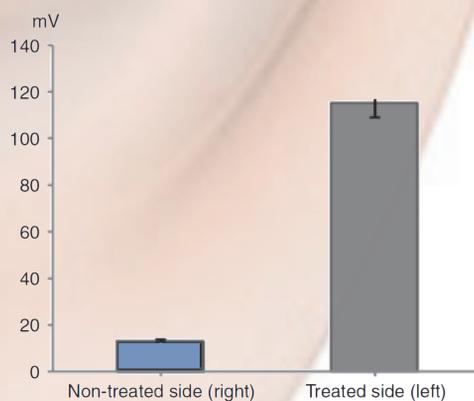


Expression de Cx30 endogène à P30



Expression de Cx30 dans une cochlée de souris à P30 après transfection de ShRNA-Cx30 par EUGO

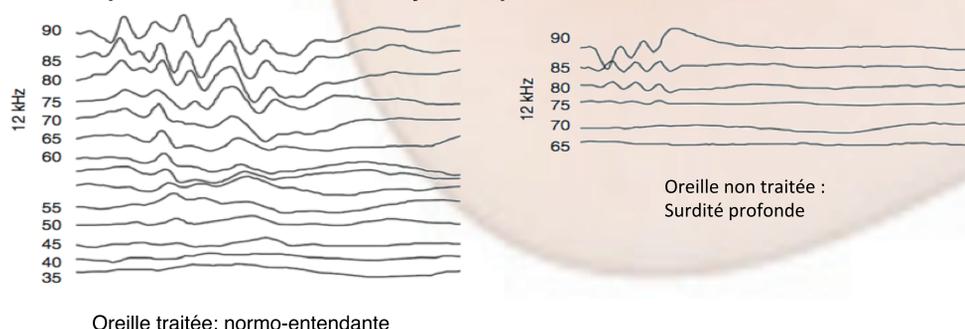
### 4 Résultats obtenus en terme de potentiel endocochléaire (en mV)



Sur des souris Cx30<sup>-/-</sup>, on réalise une transfection du gène codant pour la Cx30, au niveau de l'oreille gauche. On observe, en comparant les oreilles: droite (non traitée) et gauche (traitée), que le potentiel est restauré à gauche.

## Conclusions

Enregistrement des potentiels évoqués auditifs de souris avec ou sans transfection de Cx30 à P30: La Cx30 permet la restauration du cycle du potassium



Oreille traitée: normo-entendante

→ **Succès du modèle ShRNA**, permet la première étude *in vivo* dans la surdité génétique

→ **Efficacité de la transfection en amont de l'expression du gène**, prochaine étude sur une autre fenêtre de tir

→ **Difficultés d'adaptation à l'Homme:** différence de développement de l'appareil auditif, fonctionnel dès 3 mois et demi in utero. Pertinence d'une intervention plus précoce que chez la souris ?

### Bibliographie:

- Mouse otocyst transuterine gene transfer restores hearing in mice with connexin 30 deletion-associated hearing loss (Toru Miwa, Ryosei Minoda, Momoko Ise, Takao Yamada, Eiji Yumoto)
- MOLECULAR GENETICS OF HEARING LOSS (Christine Petit, Jacqueline Levilliers, and Jean-Pierre Hardelin)
- [www.ecoleaudioprothese.saintmalofougères.cci.fr](http://www.ecoleaudioprothese.saintmalofougères.cci.fr)
- [www.cochlea.org](http://www.cochlea.org)

Remerciement au Pr J. RUEL

→ **Transfection par EUGO fait ses preuves** (Cf Schéma) **chez la souris**

**Problèmes éthiques :** passage souris à homme, vecteur intégratif ? Alternatives possibles ?

# Au delà des implants : le réveil du cerveau sourd

Faculté de Médecine Marseille, Promotion Rufo, UE libre Neurosciences

Mélinda Magan, Jessica Mercier, Marine Mulatero, Katherine Quéant, Elodie Roca



## Introduction :

Les implants auditifs ont fourni l'audition à des milliers de personnes sourdes dans le monde. Cependant, la technologie des implants arrive à ses limites de nos jours, alors que le chemin vers une perception auditive se rapprochant de celle d'un système auditif normal reste long. Actuellement, la recherche se concentre donc sur le second partenaire du système auditif de l'implanté, le cerveau : apprendre au cerveau sourd à utiliser un implant permettrait-il d'augmenter les bénéfices perceptuels de l'implantation ?

## Rappel : physiologie de l'audition normale

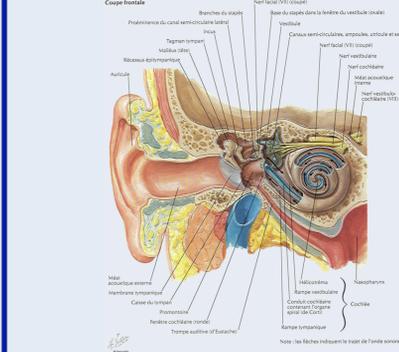
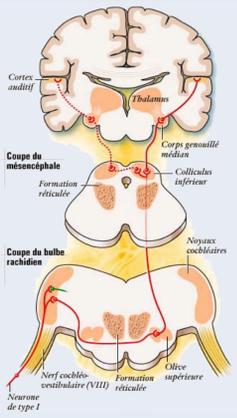


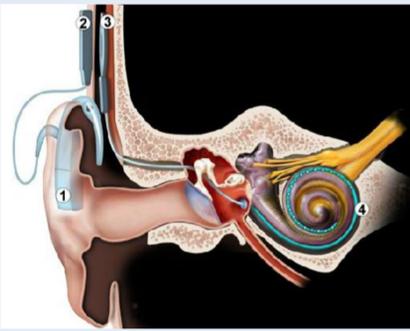
Schéma de l'oreille normale (à gauche)

La voie auditive primaire (à droite)



## Matériel et méthodes : Différents types d'implants pour différents types de surdité

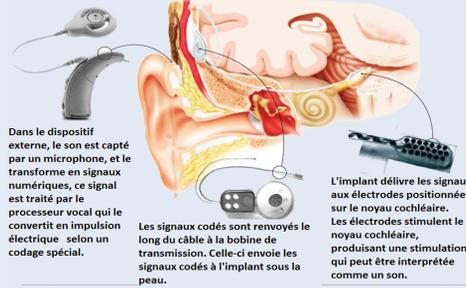
Structure d'un IC : 1 = processeur ; 2 = antenne ; 3 = partie implantée ; 4 = électrodes



Implant cochléaire (IC) : surdité neurosensorielle

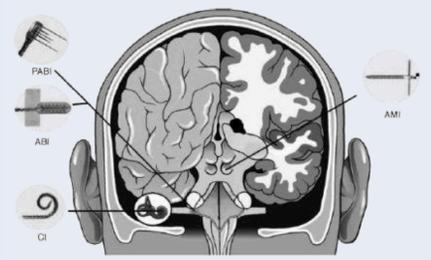
### Structure d'un implant du tronc cérébral

Une partie de l'implant ABI est implantée chirurgicalement et une autre est externe. Il fonctionne en envoyant une stimulation électrique dans le noyau cochléaire du tronc cérébral afin de produire une sensation de son.



Implant du tronc cérébral (ABI et PABI) : nerf cochléaire non fonctionnel

### Les types d'implants et leur localisation



Implant du mésencéphale : pathologies des voies sous-jacentes au site d'implantation

De plus en plus central

## Résultats

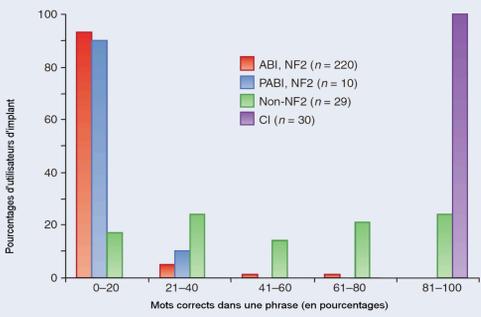


Fig. 1 : Etude comparative des performances de reconnaissance de mots des utilisateurs des différents types d'implants

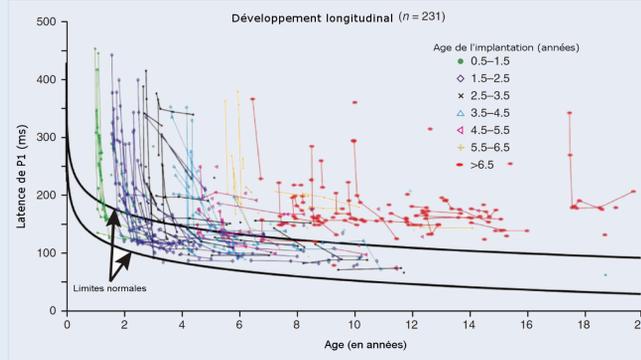


Fig. 2 : Plus l'implantation est **précoce**, plus l'**adaptation** afin d'obtenir une performance auditive normale est **rapide**. Au-delà de **6 ans**, les utilisateurs d'implant ne retrouvent pas une performance optimale.

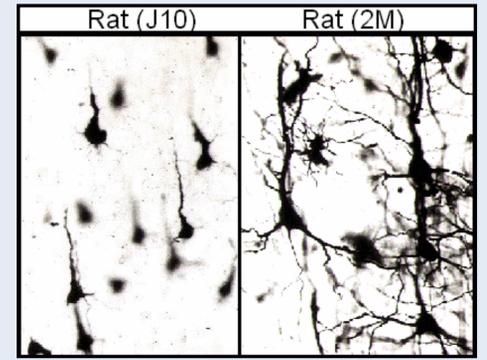


Fig. 3 : Neurones du cortex auditif primaire immature (à gauche) et en fin de développement (à droite)

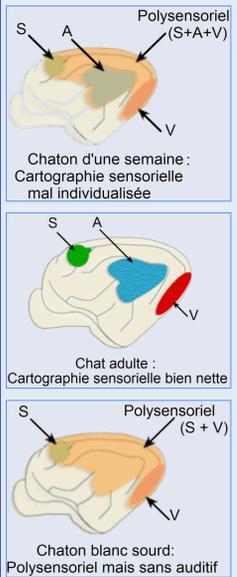


Fig. 4 : Mise en place de la **cartographie sensorielle** chez le chat

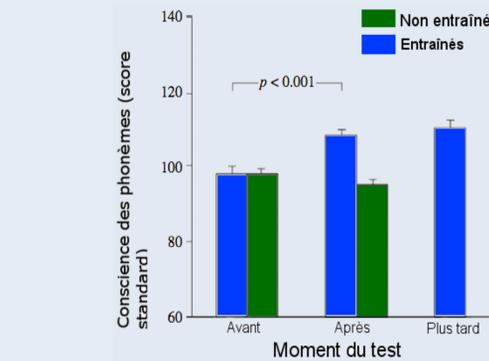
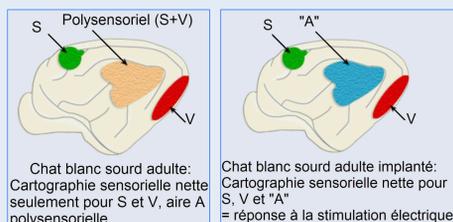


Fig. 5 : Des stimuli vocaux **réguliers et suivis dans le temps améliorent** les performances de distinction des phonèmes d'un utilisateur d'IC.

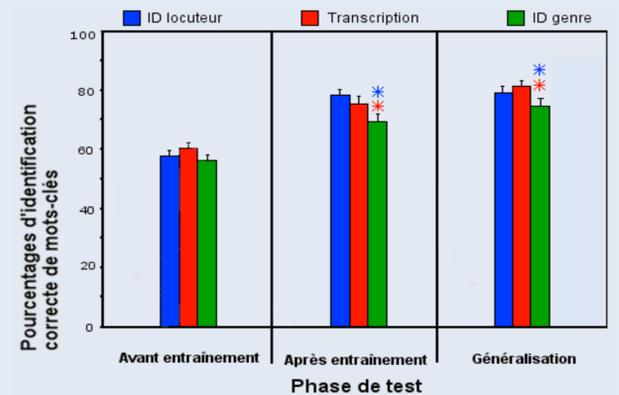


Fig. 6 : Des stimuli extra-linguistiques **réguliers et suivis dans le temps améliorent** la reconnaissance de la parole en général chez l'utilisateur d'IC.

**Conclusion :** L'implant cochléaire donne à ce jour les meilleurs résultats. Ils peuvent être potentialisés en exploitant la plasticité cérébrale : une implantation précoce suivie d'un entraînement auditif adapté sur le long terme sont nécessaires pour obtenir les meilleures performances auditives possibles. Reste à étendre ces avancées aux autres types de surdités ne pouvant bénéficier de l'IC.

**Bibliographie :** David R. Moore & Robert V Shannon, *Beyond cochlear implants : awakening the deafened brain*. Qian-Jie Fu & John J. Galvin III, *Maximizing Cochlear Implant Patients' Performance with Advanced Speech Training Procedures*. Jeremy L. Loebach & Tessa Bent, [www.medel.com/fr](http://www.medel.com/fr) [www.cisic.fr](http://www.cisic.fr) [www.neurelec.com](http://www.neurelec.com) [www.has-santé.fr](http://www.has-santé.fr) [www.cochlear.com](http://www.cochlear.com) [www.orl-marseille.com](http://www.orl-marseille.com) [www.cis.gouv.fr](http://www.cis.gouv.fr) [www.airdame.asso.free.fr](http://www.airdame.asso.free.fr) [www.cochleefrance.fr](http://www.cochleefrance.fr) [www.cochlea.eu](http://www.cochlea.eu)

Merci au Pr Jérôme Ruel



# IMPRESSION 3D DE L'OREILLE CYBORG

CHARRET Benoit-Joseph, GAITAN Léa, GUIGAL Chloé, HUBAUD Vanessa, RAVOT Stanislas, RIVIERE Justine

L3 Médecine 2013-2014, Faculté de Médecine – Timone, 27 bd Jean Moulin 13385 Marseille Cedex 5

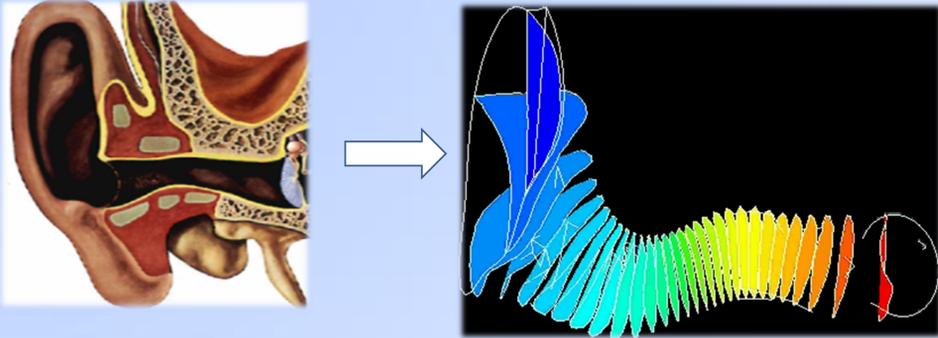
Tuteur : Dr. Jérôme Ruel

## Introduction

L'impression 3D, utilisée couramment en industrie pour la création de maquettes et de prototypes, fait désormais une apparition très prometteuse dans le domaine médical!

Une équipe de l'Université de Princeton à réussi à créer un pavillon bionique grâce à cette technique d'impression 3D.

Cette découverte laisse présager de grandes perspectives d'avenir dans plusieurs approches cliniques : chirurgie réparatrice, greffe, microtie.



La forme complexe du pavillon permet :

- D'amplifier et de focaliser du son dans le conduit auditif externe
- D'assurer la protection physique pour le reste de l'oreille

**Mots clés:** ingénierie tissulaire, impression 3D, organe cyborg, CAO.

## IMPRESSION 3D

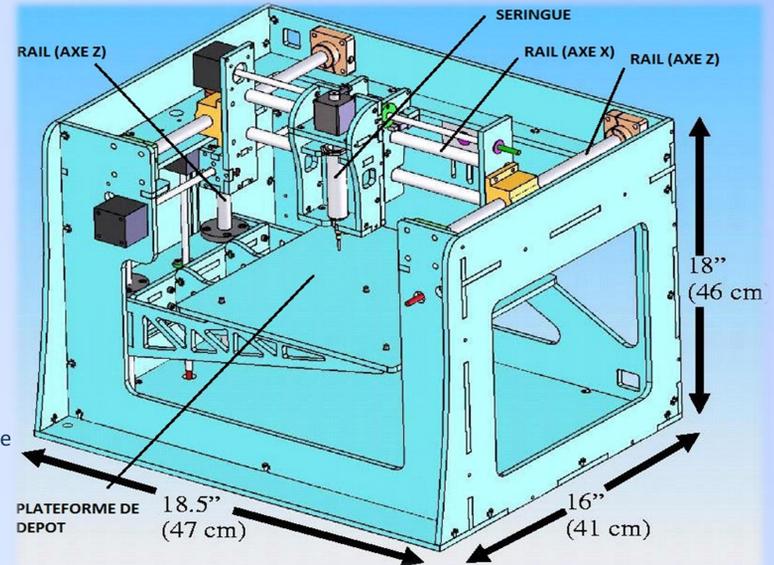
Technique de fabrication additive développée pour le prototypage rapide

### 3 techniques :

1. Modelage par dépôt de matière en fusion.
2. Frittage sélectif par laser
3. Stéréolithographie

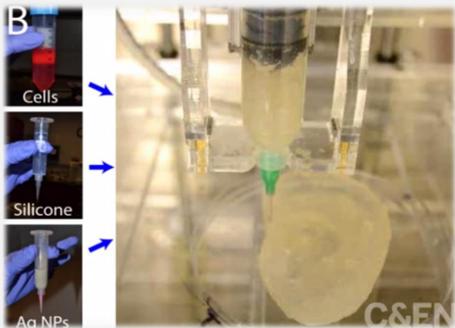
Imprimante Fab@Home:

- Conception Assistée par Ordinateur (CAO)
- Format Stéréolithographique
- Extrusion par une seringue



## 1. L'IMPRESSON D'UNE OREILLE BIONIQUE

1. Maquette de l'objet numérisée grâce au logiciel de CAO.
2. Conversion du fichier en format STL.
3. Découpage en couche.
4. Utilisation de 3 matériaux fonctionnels pour la construction, au niveau :



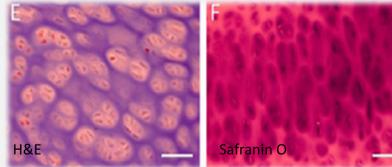
- **Structural :** Silicone
- **Biologique :** Chondrocytes précultivés avec de l'alginate d'hydrogel (densité = 60 millions de cellules/mL)
- **Electronique :** Nanoparticules d'Argent, Bobine de fil électrique imitant une cochlée

5. Impression couche par couche

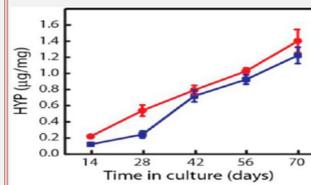
→ Obtention d'un pavillon bionique dépourvu de cartilage : nécessité d'une mise en culture

## 2. TESTS BIOLOGIQUES

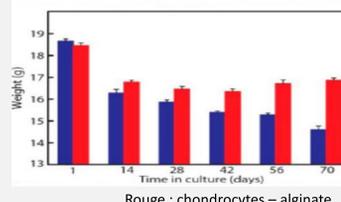
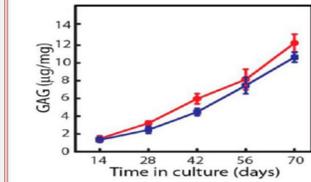
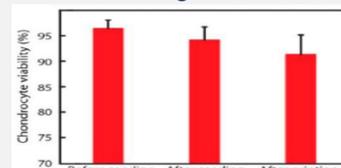
Distribution uniforme des chondrocytes et développement de nouveau cartilage



Accumulation de la matrice extra-cellulaire



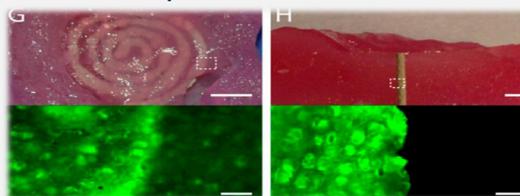
Evolution de la viabilité et résorption de l'alginate



Conservation de la structure après 10 semaines de culture



Viabilité des chondrocytes au contact de l'antenne et des électrodes



## 3. TESTS ACOUSTIQUES

Réseau de nanoparticules d'argent dans l'oreille bionique.



Tests Stéréophoniques :



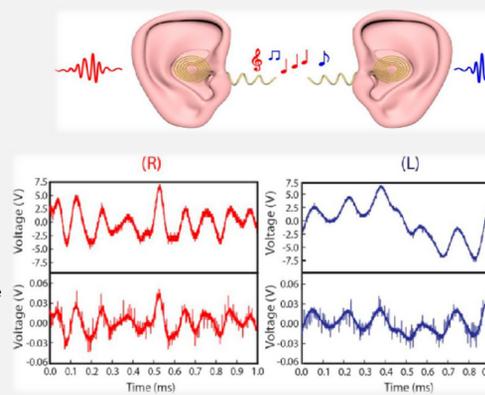
Résultats :

Tests stéréophoniques réalisés en champ libre.

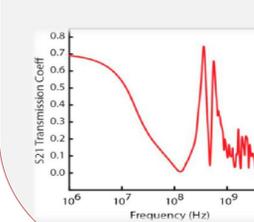
Représentation graphique de la réception sonore (voltage) par l'oreille droite et gauche sur 1 milliseconde.

La comparaison des courbes d'émission et de réception :  
- Conservation des signaux de réception propre à l'oreille droite et gauche  
-> stéréophonie conservée.

- mais bruit environnant capté.



Autres résultats avec des fréquences allant de 1 MHz à 5 GHz :



- La gamme de fréquence physiologie de l'Homme normale étant de 20Hz à 20 000 Hz avec une discrimination plus importante pour la gamme 1000Hz à 4000Hz.

- Il a été mis en évidence sur cette représentation graphique du coefficient de transmission en fonction de la fréquence; la captation sonore de fréquence inaudible pour l'homme  
-> dans la gamme des MHz et GHz apportant ainsi une audition "Supra humaine" grâce à cette oreille bionique.

## Conclusion et Perspectives



Amélioration de la prise en charge de pathologies :

- Chirurgie (réparatrice ...)
- Microtie : Malformation congénitale de l'oreille entraînant hypoacousie et surdité



Médecine personnalisée (CAO) :

- Prothèses (auditives, osseuses ...)
- Greffes (organes, tissus)



Bioprinting :

Création de tissus et d'organes transplantables (peau, vaisseaux sanguins, oreilles, rein, foie, os ...)



## Sources Bibliographiques

Plan de l'imprimante 3D: Fab@Home [http://creativemachines.cornell.edu/papers/RPJ07\\_Malone.pdf](http://creativemachines.cornell.edu/papers/RPJ07_Malone.pdf) ; SCIENCE VOL 340 7 JUNE 2013 page1163 ; NATURE NANOTECHNOLOGY VOL 8 JUNE 2013 www.nature.com/naturenanotechnology ; MOVIE 1 HI RES de Michael McAlpine ; MIT TECHNOLOGY REVIEW vol. 116 no. 5 technologyreview.com demo ; MOVIE Fox Business the Bionic Ear ; pubs.acs.org/NanoLett : 3D Printed Bionic Ears ; The New Yorker, Nov 25, 2013 the body electric by Kim Tingley.

## Remerciements

Nous tenons à remercier Dr. Jérôme Ruel, Dr. Sylvie Thirion, Pr. Alain Enjalbert, l'équipe de recherche de l'Université de Princeton ainsi que le personnel de la Faculté de Médecine de Marseille pour leur aide dans la réalisation de ce projet.



## Introduction

Les maladies dégénératives de la rétine externe sont une cause de cécité majeure dans le monde, soit 1,5 million de cas dans le monde, 25 000 cas en France. Elles sont dues à une altération des photorécepteurs. La couche externe de la rétine contient les photorécepteurs qui transforment la lumière en influx nerveux, transmis aux **cellules ganglionnaires** via les cellules bipolaires, ce qui permet ainsi de conduire le signal électrique jusqu'au cortex visuel.

Ainsi une technique mise au point par des chercheurs permet de court-circuiter ces cellules photoréceptrices déficientes en rendant directement les cellules ganglionnaires de la rétine sensibles à la lumière en utilisant une technique, élue méthode de l'année 2010 d'après Nature : l'**optogénétique**.

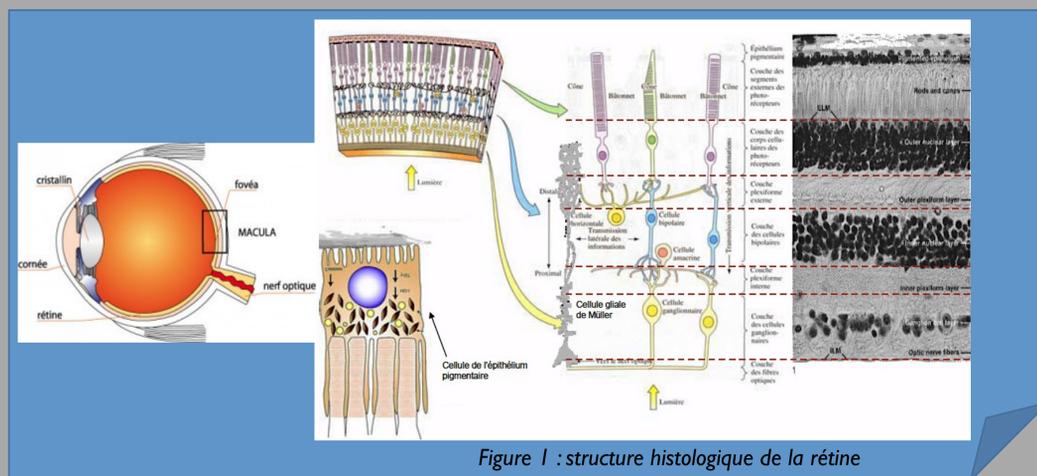
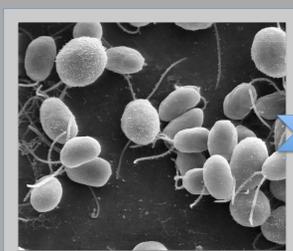


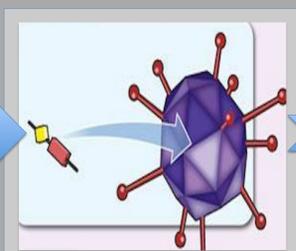
Figure 1 : structure histologique de la rétine

Dans quelles mesures l'optopharmacogénétique permet de contrôler les neurones en agissant sur les cellules rétinienne ganglionnaires dans le cadre de pathologies dégénératives de la membrane externe de la rétine ?

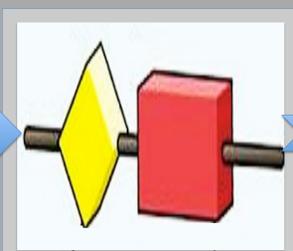
## Matériels & méthodes



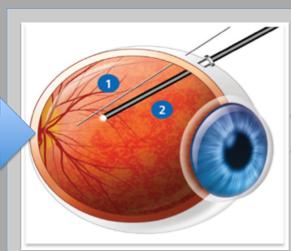
*Chlamydomonas reinhardtii*



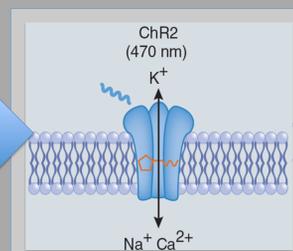
Adeno associated virus :  
Non pathogène, très peu immunogène,  
Intégration aléatoire limitée



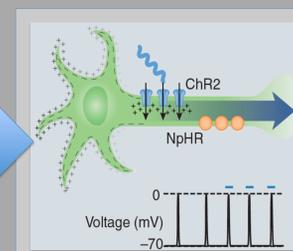
Thy 1.2 promoter  
Fort et ubiquitaire



Injection sous rétinienne  
du vecteur viral



Physiologie de la  
Channelrhodopsine 2



Déclenchement du potentiel  
d'action dans les CGR

## Qu'est ce que l'optogénétique ?

### Pourquoi l'holographie ?

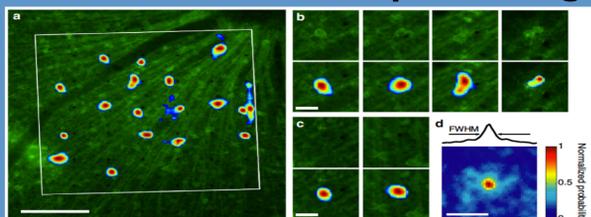


Figure 3 : Recueil et localisation des patterns suite à un « spiking » holographique

- Haute intensité
- Efficacité
- Résolution spatio temporelle
- Stimulation simultanée et parallèle de plusieurs neurones

### Les inhibiteurs

- CNQX** : inhibiteurs des récepteurs non NMDA, utile pour isoler le courant
- APV** : inhibiteurs des récepteurs NMDA
- TTX** : tétrodontoxine, inhibition de ChR2

### Enregistrement

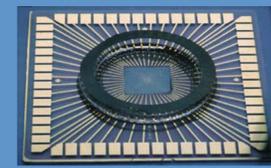


Figure 4 : électrode multi arrays

## Résultats

	Sauvage	ChR2 +
<b>Faible intensité</b> (0,1-0,15 mW.mm <sup>-2</sup> )	Témoin	++
	CNQX + APV	--
	CNQX + APV + TTX	Non réalisé (-)
	Non réalisé (-)	Non réalisé (-)
<b>Forte intensité</b> (2,6 mW.mm <sup>-2</sup> )	Témoin	++
	CNQX + APV	--
	CNQX + APV + TTX	--
	Non réalisé (-)	Non réalisé (-)

Tableau : Recueil des potentiels suite à un « spiking » holographique

### Photostimulation complexe

- Reproduire un modèle expérimental de rétinopathie *in vitro* exprimant ChR2
- On cartographie l'activité électrophysiologique des CGRs d'une rétine voyante sur laquelle on projette le film d'un chat en mouvement.
- Après avoir éliminé la réponse des CGRs aux photorécepteurs médiés par le glutamate on stimule optogénétiquement grâce à l'holographie les CGRs cartographiés précédemment.
- On arrive à reproduire chez une rétine aveugle une activités des CGRs semblable à celle d'une rétine voyante ( R=0,8)

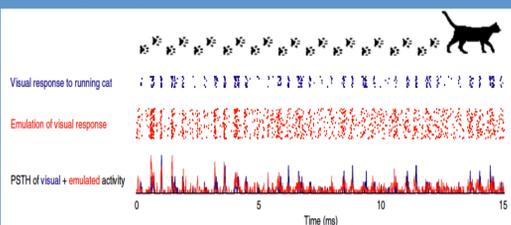


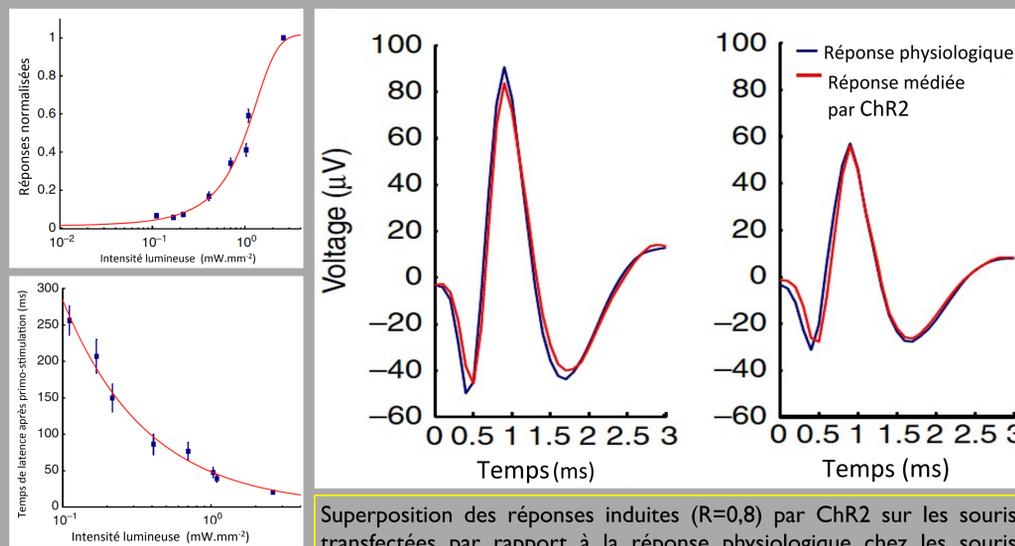
Figure 5 : Recueil des potentiels suite à une stimulation holographique complexe



Figure 6 : Electrode multi arrays

① La transfection de ChR2 permet en présence d'une **forte** intensité lumineuse (1 mW.mm<sup>-2</sup>) holographique de rétablir une activité électrique dans les CGR

② A basse intensité, pas d'activité, les CGR ne sont pas suffisamment stimulées, le seuil de dépolarisation n'est pas atteint (40 mV).



Résolution spatio-temporelle fine

Superposition des réponses induites (R=0,8) par ChR2 sur les souris transfectées par rapport à la réponse physiologique chez les souris sauvages

## Conclusions, perspectives

- L'optogénétique représente un espoir offrant une vision plus nette
- Évite le recours à la chirurgie
- Nouvelles perspectives thérapeutiques dans de nombreux domaines (cardiologie, neurologie, endocrinologie...) ainsi l'optogénétique gagne tous les organes !

## Bibliographie

Reutsky-Gefen, I. et al. "Holographic optogenetic stimulation of patterned neuronal activity for vision restoration." *Nat. Commun.* 4:1509 doi: 10.1038/ncomms2500 (2013)  
 "Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel." *Nature* 482  
 "Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae." *Science* 2002  
 "Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in chlamydomonas by immediate light-induced depolarization." *Plant Cell* 2008  
 "Remote control of behavior through genetically targeted photostimulation of neurons." *Cell* 2005



Lauren Binet, Robin Chaumard, Gauthier Glemarec, Thibault Ruiz, Julie Tronchetti  
Tuteur : Dr J. Ruel

L3 médecine, Faculté de la Timone 2013-2014

www.valbiome.fr

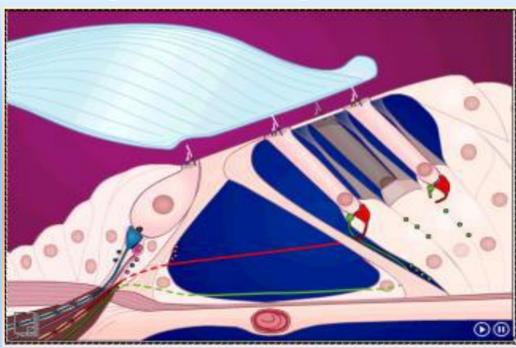
www.univ-amu.fr

## Introduction :

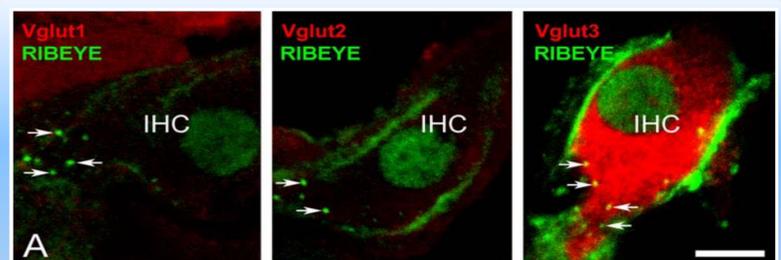
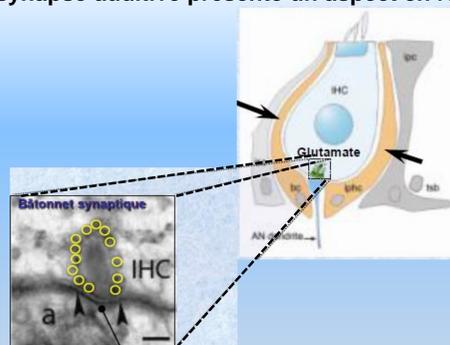
Au cours de l'audition, le son traverse l'oreille externe puis moyenne, pour arriver au niveau de l'organe de Corti situé dans l'oreille interne. Le basculement des stéréocils de la cellule ciliée interne provoque sa dépolarisation. Le transporteur vésiculaire du glutamate VGLUT3 libère dans la fente synaptique le neurotransmetteur, lequel excite la fibre auditive. Au niveau du système nerveux central, VGLUT3 est exprimé par des cellules non-glutamatergiques alors qu'au niveau de la cochlée VGLUT3 est exprimé par les cellules ciliées internes qui utilisent le glutamate comme neurotransmetteur.

Chez la souris en l'absence de VGLUT3, on observe une surdité profonde, des crises d'épilepsie ainsi qu'une perte neuronale. Cette surdité est-elle réellement provoquée par le déficit en VGLUT3 ?

## Organisation de l'organe de Corti



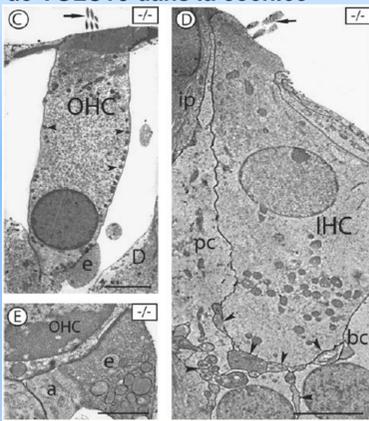
## La synapse auditive présente un aspect en ruban



Immunocytochimie: marquage de RIBEYE pour observer le pôle synaptique. Dans la cellule ciliée interne, seulement VGLUT3 est présent.

## Expériences *in vitro* sur des souris knock out (KO) pour le transporteur VGLUT3 comparées à des souris sauvages (WT)

### Conséquences morphologiques et fonctionnelles de l'absence de VGLUT3 dans la cochlée

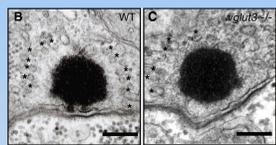


En microscopie électronique à transmission, on ne note pas d'anomalie morphologique majeure au niveau de la cochlée.

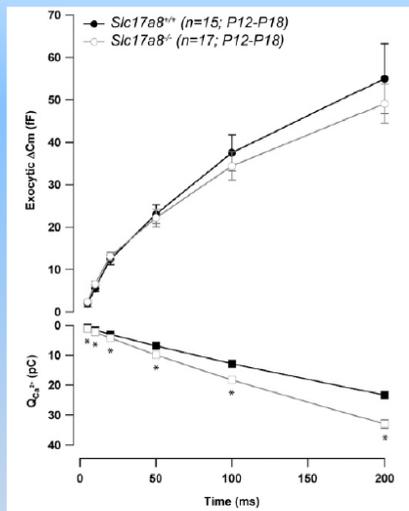
IHC: cellule ciliée interne; OHC: cellule ciliée externe; a: fibre afférente; e: fibre efférente



Différences de taille notables des vésicules synaptiques au niveau de la ligne latérale entre les modèles WT et VGLUT3 KO chez le poisson zèbre

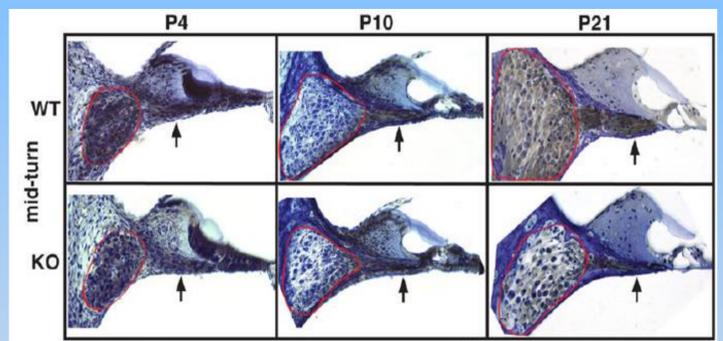


### Analyse de l'exocytose : on enregistre par la méthode du patch clamp la capacité membranaire des cellules ciliées internes

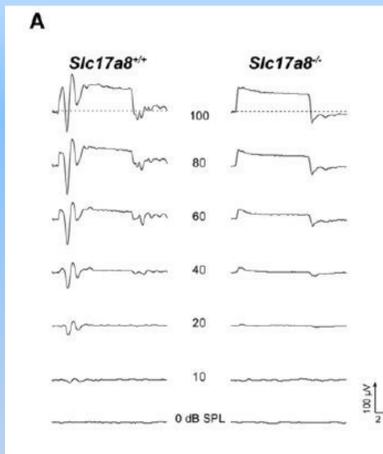


Coloration au bleu de toluidine d'une coupe de cochlée : on retrouve des synapses moins nombreuses au niveau des cellules ciliées internes qu'un amincissement de la fibre nerveuse auditive chez la souris KO VGLUT3.

Le glutamate semble jouer un rôle neurotrophique sur les fibres du nerf auditif, son absence provoquerait donc une perte neuronale.



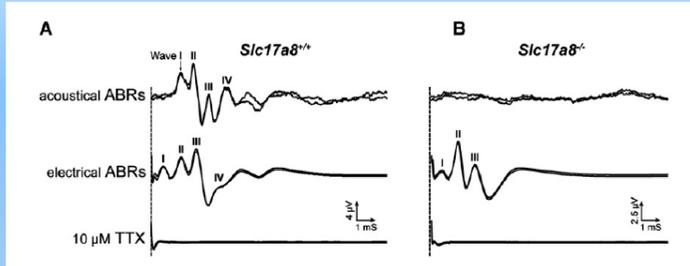
On procède à une électrocochléographie chez la souris WT et chez la souris KO à l'aide d'une électrode apposée sur la membrane de la fenêtre ronde.



Chez la souris KO, on n'enregistre pas de potentiel d'action (PA) ce qui traduit une absence d'activité dans le nerf auditif. Le potentiel de sommation (PS) lui est normal : la cellule ciliée interne fonctionne.  
→ Tout le versant post synaptique chez ces souris ne fonctionne pas.

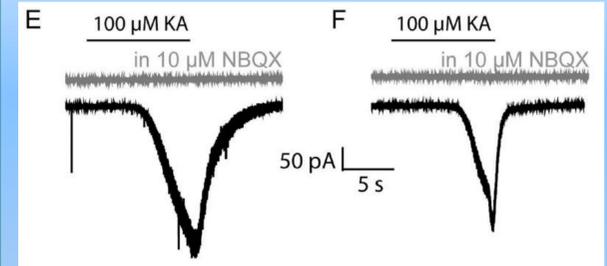
## Electrophysiologie *in vivo* chez les souris KO pour VGLUT3

On pose un implant cochléaire qui stimule électriquement la cochlée. Les potentiels évoqués provenant de la cochlée et du tronc cérébral (ABRs) sont ainsi enregistrés.



Une activité électrique est présente chez la souris KO, les fibres du nerf auditif sont donc fonctionnelles. Le défaut ne vient donc pas du nerf auditif lui-même mais bien d'un élément absent dans la fente synaptique.

Pour étudier le fonctionnement des récepteurs post-synaptiques du glutamate, on administre dans la fente synaptique du kainate, un agoniste des récepteurs AMPA.



On observe via un patch clamp dendritique *in vitro* des courants entrants chez les deux modèles murins: le récepteur AMPA impliqué dans l'audition est donc fonctionnel chez la souris KO et n'est pas responsable de la surdité.

→ La surdité observée provient donc de l'absence de libération de glutamate dans la fente synaptique en raison de l'inactivation de son transporteur vésiculaire VGLUT3.

## Conclusions

- Le gène codant pour VGLUT3 nommé Slc17a8 a été identifié sur le chromosome 12 dans une zone qui contient des loci impliqués dans la surdité génétique DFNA25 observée chez l'Homme.
- Cependant, il existe des discordances entre les phénotypes murin et humain. Chez la souris, le glutamate est absent de la fente synaptique par inactivation du gène codant pour VGLUT3. Chez l'Homme, le gène Slc17a8 est muté mais pas KO : on ne naît pas sourd.
- Ce gène muté serait donc impliqué, à l'inverse du modèle murin, dans un excès de libération de glutamate par VGLUT3 entraînant une excitotoxicité et à terme une presbyacousie précoce.
- Le nerf auditif demeurant fonctionnel, un implant cochléaire permettrait de restaurer l'audition chez des patients atteints de surdité profonde.

## Bibliographie

- J.Ruel et al (2008), Impairment of SLC17A8 Encoding Vesicular Glutamate Transporter-3, VGLUT3, Underlies Nonsyndromic Deafness DFNA25 and Inner Hair Cell Dysfunction in Null Mice, *The American Journal of Human Genetics* 83, 278-292.
- R.P.Seal et al (2008), Sensorineural Deafness and Seizures in Mice Lacking Vesicular Glutamate Transporter-3, *Neuron* 57(2): 263-275.
- N.Obholzer et al (2008), Vesicular Glutamate Transporter-3 is required for synaptic transmission in zebrafish hair cells, *The Journal of Neuroscience* 28, 2110-2118.
- J.Ruel, Cours: *Neurobiologie de l'Audition*, Sensorialité, UE Recherche Neurosciences L3, Novembre 2013.

## Remerciements

Nous tenons à remercier tout d'abord notre tuteur, le Dr. Jérôme Ruel pour sa disponibilité et ses précieux conseils dans la réalisation de ce travail. Nous remercions tout particulièrement le Dr. Sylvie Thirion pour son investissement dans la mise en œuvre de ce deuxième colloque Neuroscientifique de la faculté de médecine de Marseille, ainsi que les professeurs José Boucraut et Amapola Autillo-Touati. Nous remercions également le Professeur Alain Enjalbert ainsi que Monsieur le Doyen Georges Léonetti pour leur soutien dans ce projet.

# De l'écoute à la surdité en passant par les récepteurs AMPA



Faculté de Médecine  
Aix-Marseille Université

Frayse Céline<sup>1</sup>, Gomes de Pinho Quentin<sup>1</sup>, Kraemer Julie<sup>1</sup>, Schenone Laurence<sup>1</sup>, Tillol Juliette<sup>1</sup>

<sup>1</sup>: L3 Médecine



www.univ-amu.fr

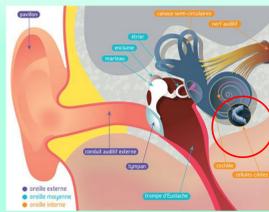
www.valbiome.fr

## Introduction:

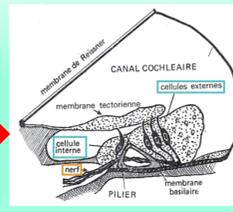
### Dans l'audition normale :

- Un seul type de synapse : entre la cellule ciliée interne et le neurone auditif.
- Physiologiquement, un neurotransmetteur, le glutamate, qui se fixe sur un seul type de récepteur : le récepteur AMPA.
- Le glutamate induit une **excitotoxicité** lors d'une libération excessive et provoque des pertes auditives temporaires visible sur un audiogramme clinique (TTS).
- Dans l'hippocampe, il existe un **mécanisme de régulation** du nombre de récepteurs AMPA membranaires. 1,2
- Le but de ces travaux est de caractériser l'existence d'un **mécanisme de régulation des récepteurs AMPA de la synapse auditive**, et s'il existe, de déterminer son impact sur la fonction auditive ?

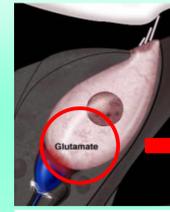
### L'oreille



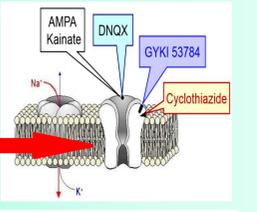
### La cochlée



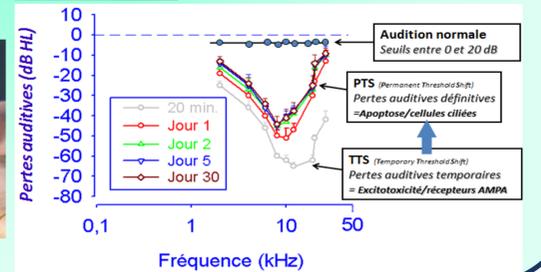
### La synapse auditive



### Le récepteur AMPA



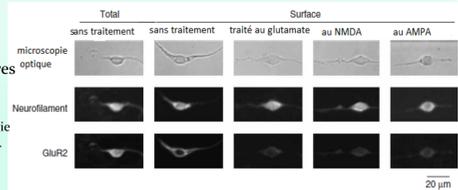
**Son traumatique :**  
Fréquence pure  
6kHz, 115-130 dB, 15 min.



## Méthodes:

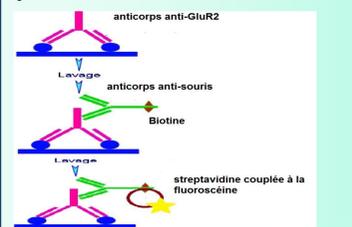
### 1: Culture cellulaire:

On réalise des cultures cellulaires de neurones auditifs chez des jeunes souris de 6-8 jours. Observation des cellules par microscopie optique et immunomarquage de GluR2.



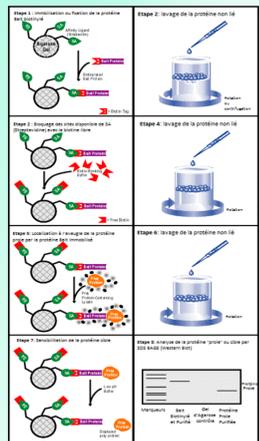
### 2: Immunohistochimie:

Méthode de localisation de protéines par détection d'Ag au moyen d'Ac (primaire et secondaire) couplé à des fluorochromes dans une solution de Périlymphe artificielle.



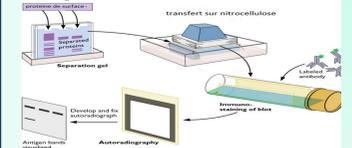
### 3: Biotinylation :

- anesthésie des souris puis prélèvement et lavage de cochlées
- refroidissement à 4°C, lavage avec une solution EZ-link NHS-SS-biotine (1mg/ml), pH8
- application d'une solution d'inhibiteur de protéase (pour amplifier le signal)
- incubation avec de la streptavidine couplée à des billes magnétiques à T° ambiante
- récupération des billes, rinçage, centrifugation
- incorporation d'enzyme (inhibiteur de protéase) avec une solution tampon pour le western blot



### 4: Western Blot:

Après marquages, elle permet d'identifier une protéine selon son poids moléculaire grâce à une électrophorèse.



### 5: Potentiels évoqués auditifs:

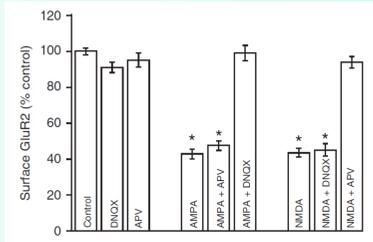
Mesure objective des seuils audio métriques reflétant l'activité des nerfs auditifs de la périphérie au cortex. Expérience réalisée sur des souris anesthésiées avant et après l'exposition à un bruit traumatique (1 - 40kHz). Recueil réalisé grâce à des électrodes d'enregistrement de surface positionnées au contact de l'oreille testée ainsi qu'au vertex. L'activité des cellules ciliées externe est enregistrée grâce à la technique des produits de distorsion acoustique : DPOAEs.



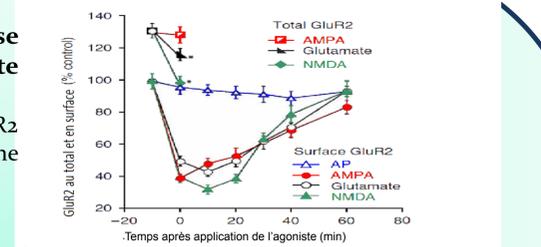
## Résultats:

**Fig1: Variations des taux de sous unité GluR2 en réponse à l'application de 20µM de NMDA, AMPA ou Glutamate pendant 10 minutes.**

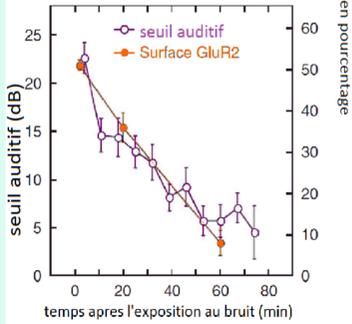
Le Glu et le NMDA entraînent une diminution des GluR2 membranaires ainsi que des GluR2 totaux. L'AMPA provoque une diminution des GluR2 membranaires mais pas des GluR2 totaux.



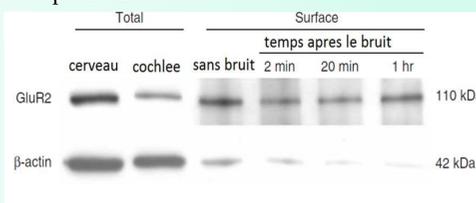
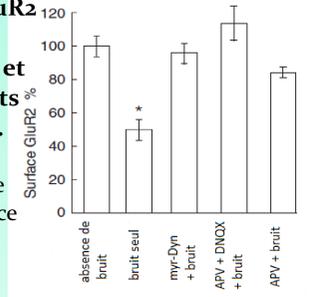
**Fig2: Effets des antagonistes des récepteurs AMPA et NMDA (DNQX à 20 µM et APV à 50 µM) sur le taux des sous unités GluR2 de surface.** Expérience mettant en évidence le rétro-contrôle des récepteurs AMPA et un éventuel rôle des récepteurs NMDA dans cette régulation.



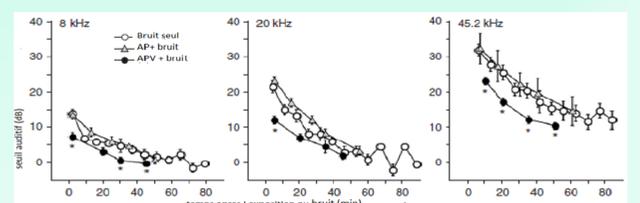
**Fig3: Variation du seuil auditif (PEA) en fonction de l'expression des sous unités GluR2 à la membrane après traumatisme acoustique.** (bruit large bande de fréquence 1 à 40kHz, d'intensité 116dB). Le seuil auditif est corrélé avec le nombre de récepteur AMPA.



**Fig4: Quantification de la sous unité GluR2 en fonction du trauma acoustique et en présence d'agents pharmacologiques.** On remarque qu'en présence d'antagoniste des récepteurs AMPA ce dernier n'est plus internalisé même en présence de bruit.



**Fig5: Expression de la sous unité GluR2 avant et après trauma acoustique en western blot.** Quantification de GluR2 membranaire après un trauma acoustique. On remarque une récupération de ces récepteurs 1h après cette stimulation.



**Fig6: Variation du seuil audiométrique en fonction de la stimulation.** Les cochlées sont stimulées avec chacune une fréquence (8kHz, 20kHz, 45,2kHz). Les variations du seuil audiométrique sont examinées après l'exposition au bruit. Les seuils audiométriques pour fréquence aigu ne récupère pas totalement, on est dans un trauma acoustique.

## Conclusions et perspectives :

Il existe un phénomène d'**internalisation des récepteurs AMPA** au niveau post-synaptique des neurones auditifs suite à la libération de glutamate par les cellules ciliées internes de la cochlée. On peut noter qu'il existe une **implication des récepteurs NMDA** dans le cycle d'expression des récepteurs AMPA en condition pathologique. L'ensemble de ces processus concourt notamment à diminuer l'excitotoxicité glutamatergique et permet ainsi une **protection endogène** de notre audition. Il existe un antagoniste à large spectre du glutamate, le **kynurénate**<sup>3</sup>, qui permet une **protection partielle** de notre audition contre certains dommages provoqués par une stimulation sonore trop intense. Celui-ci, en inhibant les récepteurs AMPA, empêche l'**excitotoxicité**. Toute fois, il ne permet pas la préservation des cellules ciliées externes, elles aussi capitales à notre audition, qui disparaissent par un autre mécanisme : l'apoptose.

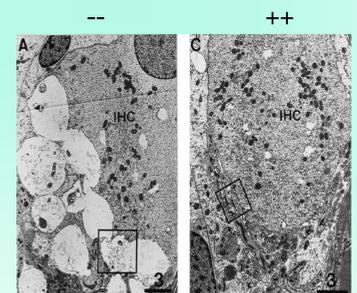
### Après traumatisme acoustique :

#### Cellule ciliée externe

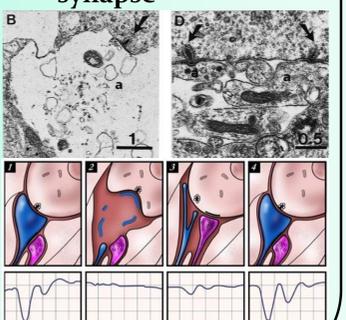


#### La synapse:

##### Kynurénate -- Kynurénate ++



#### Phénomènes de réparation de la synapse



**Bibliographie:** Zhiqiang Chen, Sharon G Kujawa & William F Sewell. Auditory sensitivity regulation via rapid changes in expression of surface AMPA receptors (nature neuroscience 2007). Heng-Ye Man, Jerry W. Lin, William H. Jo, Gholamreza Ahmadian, Lidong Liu, Laurence E. Becker, Morgan Sheng & Yu Tian Wang. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by Clathrin-dependant receptor internalization (neuron 2000)1. Song-Hai Shi, Yasunori Hayashi, José A. Esteban & Roberto Malinow. Subunit-specific rules governing AMPA Receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons (Cell.2001)2. Jean luc Puel, Jérôme Ruel Christine Gervais d'Aldin & Rémy Pujol. Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss (NeuroReport 1998) 3. Millard G. Cull, Peter J Schatz Biotinylation of proteins in vivo and in vitro using small peptide tags (methods in enzymology vol.326).

# VGLUT3 : La thérapie génique de l'oreille interne enfin possible

Sensorialité

Florence Dupessey<sup>1</sup>, Céline Florent<sup>1</sup>, Naïs Girard<sup>1</sup>, Clémence Lavier<sup>1</sup>, Alexandre Spinazze<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>L3 UE Neurosciences Faculté de Médecine Timone Marseille

www.univ-amu.fr

## Introduction

La surdité est un des déficits sensoriels les plus courants chez l'Homme, on en distingue deux types : congénitale et acquise. On recense 1,5 cas de surdité congénitale pour 1 000 naissances, dont les ¾ sont d'origine génétique. Parmi elles, la plus fréquente des surdités de l'enfant est liée à une mutation du gène codant pour les **connexines**.

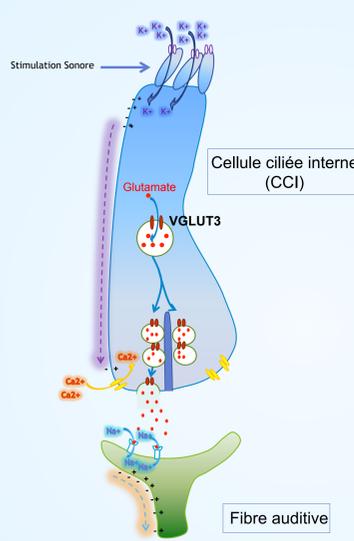
Ici nous nous intéressons à un autre type de surdité congénitale, la **DFNA25**, causée par une mutation dans le gène codant pour un transporteur vésiculaire du glutamate, **VGLUT3**.

Tous les traitements actuels s'avèrent n'être que symptomatiques : ils ne traitent pas la mutation génétique causale, d'où la volonté d'élaborer un traitement étiologique par thérapie génique.

Le modèle animal utilisé est, par excellence, la souris KO pour VGLUT3 : le transporteur du glutamate étant absent, les vésicules synaptiques sont vides. Il n'y a aucune libération du neurotransmetteur et donc pas de transmission du message nerveux.

On va ainsi tenter de rétablir l'audition en amenant le gène médicament par thérapie génique, pour restaurer l'expression de VGLUT3 et peut-être la transmission synaptique dans les cellules ciliées.

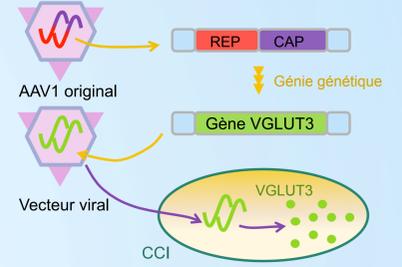
### Physiologie de la synapse auditive



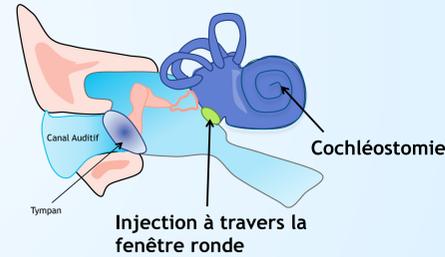
## Méthodologie

### 1) Transfection AAV1-VGLUT3

- Clonage cDNA VGLUT3
- Production du vecteur AAV1-VGLUT3
- Injection du vecteur dans la cochlée
- Reconnaissance et endocytose par les CCI
- ADN viral non intégré dans le génome



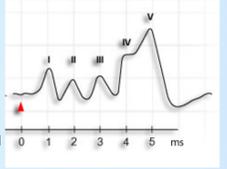
### 2) Techniques chirurgicales



### 3) Enregistrement des Potentiels évoqués auditifs (PEA)

Electrodes placées sur le crâne enregistrent:

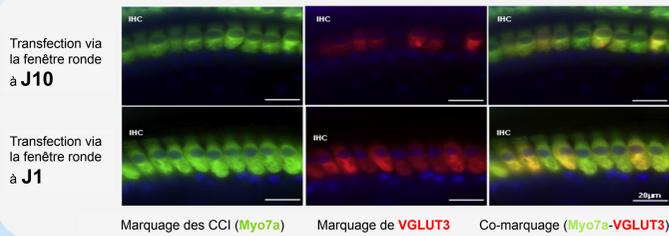
- I : potentiel d'action du nerf auditif
- II, III, IV, V : noyaux relais du tronc cérébral



## Expériences et résultats

### 1) Transfection AAV1-VGLUT3 dans la cochlée

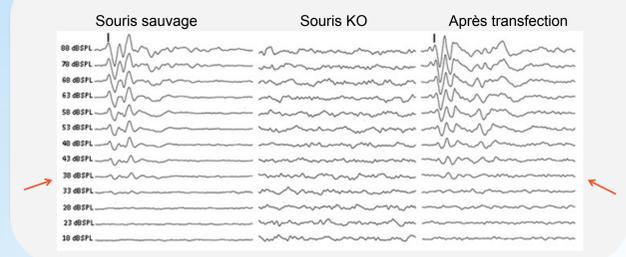
- L'anticorps anti VGLUT3 ne marque que les CCI. Après transfection on a donc une expression localisée de VGLUT3 dans les CCI, comme chez les souris sauvages.
- Expression de la transfection selon le stade de développement de la cochlée



- Expression selon la technique chirurgicale
- Cochléostomie : récupération fonctionnelle chez 17% des souris
- Injection via la membrane ronde : récupération chez 100% des souris

### 2) Effets de la transfection sur l'audition : tests fonctionnels

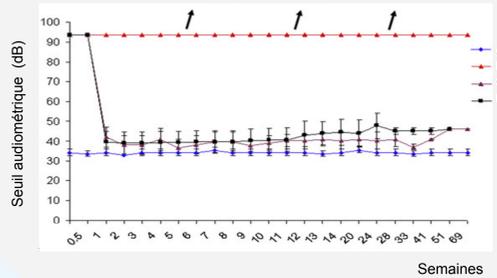
#### Potentiels évoqués auditifs (PEA)



- Souris sauvage : seuils audiométriques dans la normale (environ 30 dB)
- Souris KO : pas de seuil, surdité totale
- Après transfection : récupération fonctionnelle des seuils audiométriques

### 3) Stabilité de la récupération fonctionnelle dans le temps

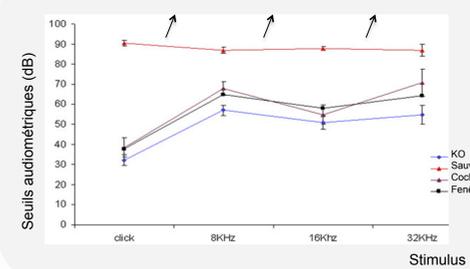
#### Seuils audiométriques obtenus par PEA au cours du temps



- Souris KO : aucune réponse électrophysiologique
- Après transfection :
- Récupération de seuils audiométriques normaux en moins de 2 semaines
- Stabilité de la restauration fonctionnelle

### 4) Restauration complète de l'audition pour toute la gamme de fréquence de l'audiogramme

#### Seuils audiométriques obtenus par PEA après transfection

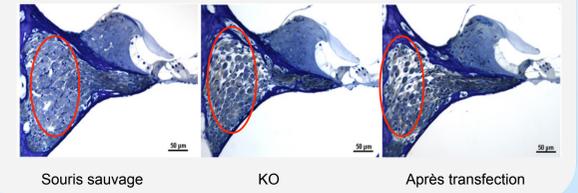


Restauration de la fonctionnalité de la cochlée de la base à l'apex, i.e. du codage des hautes et basses fréquences respectivement.

### 5) Restauration incomplète de la morphologie synaptique

- Rôle neurotrophique du glutamate ?

#### Nombre de neurones du ganglion spiral

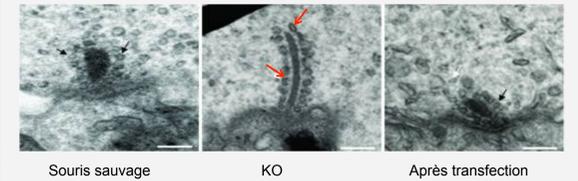


Souris KO et transfectées : 18% de neurones en moins par rapport aux souris sauvages

→ Perte neuronale → Neuropathie auditive

- Restauration de la morphologie du ruban et des vésicules

#### Microscopie électronique du ruban synaptique



→ Vésicules allongées (anormales) → Vésicules circulaires (normales)

## Conclusions et perspectives

Obtention d'une récupération fonctionnelle complète chez des souris sourdes profondes. C'est le premier succès de thérapie génique de l'oreille interne.

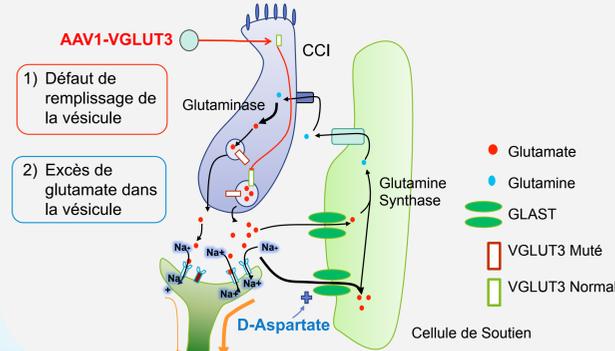
### 1) Existe-t-il chez l'homme une surdité impliquant VGLUT3 ?

Chez l'homme VGLUT3 est codé par SLC17A8 et de nombreuses études ont montré le lien entre le gène de VGLUT3 et la DFNA25. DFNA25 est une surdité non syndromique correspondant à une presbycusie précoce liée à la mutation faux sens 632C>T (Alanine remplacée par une Valine).

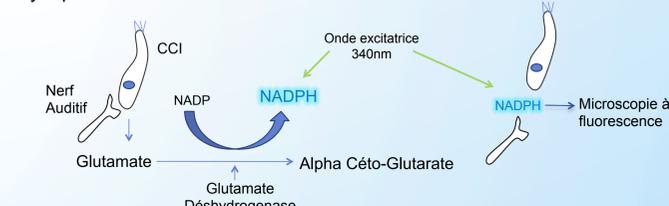
### 2) Le modèle KO de VGLUT3 reproduit-il la physiopathologie de DFNA25 ?

- KO VGLUT3 : modèle réductif par perte de la libération de glutamate
- Ne reproduit pas l'atteinte humaine : pas de surdité à la naissance, mais presbycusie précoce
- Hypothèse : Il s'agit d'un gain et non pas d'une perte de fonction (VGLUT3 rempli trop les vésicules de glutamate → Excitotoxicité)

### Les différentes physiopathologies possibles de DFNA25 et leur traitement potentiel



Expérience à réaliser : démonstration de l'excès de glutamate dans la synapse in vivo



### 3) La méthode d'injection utilisée pour administrer le gène médicament est elle utilisable en thérapeutique humaine ?

Modèle avec Gelfoam®

## Remerciements et bibliographie

Nous remercions notre tuteur le Dr. Jérôme Ruel pour toute son aide, mais aussi le jury, la faculté de médecine et les auteurs de l'article source: O. Akil, R. Seal, C. Wang, A. Alemi, M. Doring, R. Edwards, L. Lustig.

M. Lesperance & al. DFNA25, a Novel Locus for Dominant Nonsyndromic Hereditary Hearing Impairment, Maps to 12q21-24. The American Journal of Human Genetics, Volume 68, Issue 1, January 2001, Pages 254-260A; K. Lalwani & al. Cochlear Gene Delivery through an Intact Round Window Membrane in Mouse. Human Gene Therapy, March 2001, 12(5): 539-548; J. Ruel & al. Impairment of SLC17A8 Encoding Vesicular Glutamate Transporter-3, VGLUT3, Underlies Nonsyndromic Deafness DFNA25 and Inner Hair Cell Dysfunction in Null Mice. The American Journal of Human Genetics, Volume 83, Issue 2, 8 August 2008, Pages 278-292; P. Zheng & al. Two free radical pathways mediate chemical hypoxia-induced glutamate release in synaptosomes from the prefrontal cortex. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Volume 1823, Issue 2, February 2012, Pages 493-504; L. R. Lustig & al. Restoration of Hearing in the VGLUT3 Knockout Mouse Using Virally Mediated Gene Therapy. Neuron, Volume 75, Issue 2, 26 July 2012, Pages 283-293. Site: Voyage au centre de l'audition.