

Université de Montréal

**Expression développementale du mécanorécepteur Piezo2 dans la  
tête de l'opossum *Monodelphis domestica***

Par Jessica Laforge

Département de Sciences Biologiques

Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)  
en sciences biologiques

Juillet 2022

©Jessica Laforge, 2022

Université de Montréal  
Faculté des arts et des sciences

Cette thèse intitulée

**Expression développementale du mécanorécepteur Piezo2 dans la  
tête de l'opossum *Monodelphis domestica***

Présentée par  
Jessica Laforge

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Dr. Annie Angers  
Présidente-rapporteure

Dr. Jean-François Pflieger  
Directeur de recherche

Dr. Thérèse Cabana  
Examinatrice interne

Dr. Hughes Leblond  
Examineur externe



## Résumé

Comme tous les marsupiaux, l'opossum *Monodelphis domestica* naît dans un état très immature – glabre, aveugle, sourd – mais doit grimper sur le ventre de la mère pour trouver une tétine à laquelle il s'accroche afin de poursuivre son développement. Pour ce faire, il rampe à l'aide de ses membres antérieurs, qui sont mobiles contrairement aux membres postérieurs, et se dirige vers une tétine qu'il avale partiellement. Des sens céphaliques sont nécessaires pour qu'il trouve la tétine et s'y accroche. Le toucher est un des sens qui est fonctionnel dès la naissance. Ce sens repose sur des cellules spécialisées qui ont la propriété de percevoir des déformations mécaniques des tissus et d'y répondre en déclenchant l'activation de fibres nerveuses. Cette propriété s'appelle mécanotransduction et est rendue possible par la présence de récepteurs moléculaires à la surface des cellules dont la tâche est de réagir aux stimuli mécaniques afin de provoquer la réponse. Peu de ces récepteurs ont été formellement identifiés et caractérisés. Toutefois, Piezo2 est un canal transmembranaire retrouvé dans une vaste gamme de mécanorécepteurs et qui joue un rôle crucial dans la perception du toucher, en plus d'être impliqué dans la vestibulation (sens de l'équilibre) et l'audition. Le rôle de Piezo2 a surtout été étudié chez des mammifères euthériens matures. Peu d'études ont porté sur son expression développementale, et aucune ne concernait les marsupiaux. L'objectif principal de cette thèse était de décrire l'expression de Piezo2 au niveau de la tête d'opossums en développement.

L'expression du gène a été examinée par RT-PCR et hybridation *in situ*, alors que la présence de la protéine a été démontrée par immunohistochimie. La RT-PCR montre une expression de l'ARNm de Piezo2 à tous les âges à partir de la naissance jusqu'au 21<sup>e</sup> jour postnatal (P21). L'immunohistochimie n'a pas permis de mettre en évidence Piezo2 dans la peau faciale ni chez les nouveau-nés ni chez l'adulte. Cependant, Piezo2 est présent dans l'oreille interne dès la naissance.

Dans le vestibule, le marquage Piezo2 est observé sous la forme de disques à la surface de l'épithélium dans la macule utriculaire dès la naissance et dans la macule sacculaire et les crêtes ampullaires à P7. Ces disques ont une morphologie similaire à ceux formés par l'accumulation d'actine où se développent les cils des cellules ciliées, ce qui permet de penser que Piezo2 se trouve à la surface des cellules ciliées présomptives. Dans la cochlée, la protéine est aussi présente sur toute la surface apicale de l'organe de Corti présomptif. Avec l'âge, le patron de marquage se restreint à la surface des cellules ciliées externes, dont les trois rangées sont visibles à P11. À P14, les disques de marquage Piezo2 sont bien nets dans tous les organes sensoriels de l'oreille interne. Du marquage Piezo2 a aussi été observé dans la membrane tectoriale de la cochlée et les membranes otolithiques des macules vestibulaires, ce qui suggère qu'il joue un rôle dans le développement de ces structures acellulaires.

Ces résultats suggèrent que Piezo2 n'est pas impliqué dans la mécanosensation tactile faciale à la naissance et pourrait jouer un rôle mineur dans le toucher chez l'opossum. L'expression de Piezo2 dans l'oreille interne indique qu'une forte maturation des cellules ciliées a lieu au cours de la 1<sup>re</sup> semaine postnatale dans la macule utriculaire et lors de la 2<sup>e</sup> semaine pour les autres organes sensoriels vestibulaires. Les cellules ciliées cochléaires auraient une maturation un peu plus tardive, au cours de la 2<sup>e</sup> semaine postnatale. La forte présence de Piezo2 dans l'épithélium cochléaire dès la naissance, alors que les cellules ciliées sont encore indifférenciées, suggère que cette molécule pourrait jouer un rôle dans la différenciation cellulaire. En résumé, cette étude montre que Piezo2 n'est pas impliqué dans la mécanosensation précoce chez l'opossum, mais qu'il joue un rôle dans le développement de la vestibulation et de l'audition.

**Mots-clés** : Piezo2, mécanotransduction, développement, systèmes sensoriels, tête, marsupiaux.

## Abstract

Like most marsupials, the opossum *Monodelphis domestica* is born in a very immature state, *ie.* blind, glabrous and deaf. To pursue its development and growth, the newborn crawls with its forelimbs on its mother's belly to find a teat where it attaches. Cephalic senses are needed to find the teat and trigger the attachment. Touch is one of the senses, which depends on mechanoreceptors, sensory cells capable of perceiving the mechanical changes in tissues and to transmit them as neural inputs, a process called mechanotransduction. Of the few molecular receptors underlying mechanotransduction identified so far, Piezo2 is the best candidate. It is a mechanosensitive cation channel found in a wide variety of mechanoreceptors and plays a crucial role in the perception of touch, as well as having been linked to the vestibular and auditory vestibular systems. While having been well characterized in mature eutherian mammals, few studies have looked at its role during ontogenesis and none were done in marsupials. The main objective of this thesis was to describe the developmental expression of Piezo2 in the head of the opossum.

Gene expression was examined by RT-PCR and *in situ* hybridization, while the presence of the protein was demonstrated by immunohistochemistry. RT-PCR has shown that gene expression of Piezo2 is present from birth (postnatal day 0, P0) until P21. Immunohistochemistry did not reveal the presence of Piezo2 in cephalic skin tissues at any stage from birth to adulthood. However, Piezo2 is present in the inner ear from birth onwards. In the vestibular labyrinth, disk-shaped patches of Piezo2 labeling are present in the utricular macula at P0 and can be observed at P7 in the saccular macula and in the crista ampullaris. In all these sensory organs, Piezo2 labeling is similar to that of disk-shaped patches of actin accumulation where the stereocilia of hair cells develop. This suggests that Piezo2 is located at the surface of the hair cells in the inner ear. In the

auditory system, the protein is present over the surface of the whole presumptive organ of Corti at P0. With age, Piezo2 labeling was restricted to the apical surface of the outer hair cells by P11. At P14, numerous discs are present in all the sensory organs of the inner ear and the only difference with P21 seems to be an increase in their number. Piezo2 labeling was also observed in the tectorial membrane of the cochlea and the otolithic membranes of the macula, suggesting that it plays a role in the development of these acellular structures.

These results indicate that Piezo2 is not involved in skin facial mechanosensation at birth in the opossum and may be less important in the perception of touch in marsupials than in eutherians. The pattern of expression of Piezo2 in the vestibular system suggests that the maturation of the hair cells is important during the first postnatal week in the utricular macula and during the second postnatal week in the other vestibular sensory organs. The hair cells in the organ of Corti are maturing more during the late second postnatal week. Moreover, the strong expression of Piezo2 in the undifferentiated cochlear epithelium during the first postnatal weeks suggests that it may play a role in the differentiation of the cells of the organ of Corti of the opossum *Monodelphis domestica*. In summary, this study highlights that Piezo2 is not involved in early mechanosensation in opossums but plays a role in the development of both the vestibular and auditory systems.

**Key words:** Piezo2, mechanotransduction, development, sensory systems, head, marsupials.

# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>9</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>11</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>13</b>
<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	<b>15</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>17</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>19</b>
1.1 La mécanotransduction .....	21
1.1.1 Canaux ioniques mécanosensibles .....	22
1.2 Famille des Piezo : Piezo1 et Piezo2 .....	24
1.2.1 Structure et mécanisme d'action .....	24
1.2.2 Localisation tissulaire et cellulaire .....	28
1.3 Tégument et sens du toucher .....	31
1.3.1 Système du trijumeau .....	33
1.3.2 Piezo2 et récepteurs cutanés .....	36
1.3.3 Développement du système du trijumeau .....	37
1.4 Oreille interne .....	41
1.4.1 Système vestibulaire .....	43
1.4.2 Système cochléaire .....	49
1.4.3 Récepteurs des cellules ciliées auditives .....	57
1.4.4 Développement de l'oreille interne .....	61
1.4.4.1 Développement de la vésicule otique .....	61
1.4.4.2 Développement du labyrinthe vestibulaire .....	63
1.4.4.3 Développement de la cochlée .....	66

1.5 Le modèle d'étude, l'opossum <i>Monodelphis domestica</i> .....	71
1.5.1 La naissance et le nouveau-né .....	72
1.5.2 L'état du système nerveux central à la naissance .....	74
1.5.3 Les sens influençant le nouveau-né .....	77
1.6 Problématique .....	80
<b>2. Matériels et Méthodes</b> .....	<b>83</b>
2.1 RT-PCR avec extraction par colonne de purification .....	84
2.2 Hybridation <i>in situ</i> .....	85
2.3 Immunohistochimie .....	90
<b>3. Résultats</b> .....	<b>95</b>
3.1 Peau faciale .....	95
3.1.1 Hybridation <i>in situ</i> .....	95
3.1.2 Immunohistochimie .....	98
3.2 Système vestibulaire .....	101
3.2.1 RT-PCR .....	101
3.2.2 Développement de Piezo2 dans le système vestibulaire .....	103
3.2.3 Développement des faisceaux de stéréocils du système vestibulaire ...	106
3.3 Système cochléaire .....	110
3.3.1 Développement de Piezo2 dans le système cochléaire .....	110
3.3.2 Développement des faisceaux de stéréocils de l'organe de Corti .....	113
<b>4. Discussion</b> .....	<b>115</b>
4.1 Considérations méthodologiques .....	116
4.2 Peau faciale .....	118
4.3 Système vestibulaire .....	121
4.4 Système cochléaire .....	125
<b>5. Conclusion générale</b> .....	<b>133</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>137</b>

# Liste des figures

## Chapitre 1 – Introduction

Figure 1.	Conformation et activation des protéines Piezos chez la souris . . . . .	27
Figure 2.	Localisation des canaux Piezos dans le corps humain . . . . .	30
Figure 3.	Trois mécanorécepteurs et de leurs terminaisons afférentes . . . . .	32
Figure 4.	Principale voie trigéminal centrale des mécanorécepteurs du visage chez les mammifères . . . . .	35
Figure 5.	Étapes du développement du système du trijumeau chez l’opossum ( <i>Monodelphis domestica</i> ) et le rat de laboratoire ( <i>Sprague dawley</i> ) . . . . .	40
Figure 6.	Oreille interne . . . . .	42
Figure 7.	Organes sensoriels vestibulaires chez un mammifère adulte . . . . .	44
Figure 8.	Noyaux vestibulaires chez l’humain . . . . .	48
Figure 9.	Schéma du système cochléaire chez un mammifère adulte . . . . .	51
Figure 10.	Visualisation par microscopie électronique à balayage des stéréocils chez différentes espèces . . . . .	53
Figure 11.	Principales voies auditives centrales chez l’humain . . . . .	56
Figure 12.	Localisation des canaux de transductions ioniques sur les cellules ciliées auditives de la souris . . . . .	59
Figure 13.	Courant de polarité normal et inversé des cellules ciliées externes cochléaires chez la souris postnatale . . . . .	60
Figure 14.	Développement de la vésicule otique . . . . .	62
Figure 15.	Nouveau-nés marsupiaux . . . . .	71
Figure 16.	Opossum <i>Monodelphis domestica</i> à la naissance . . . . .	73

### Chapitre 3 – Résultats

Figure 17.	Hybridation <i>in situ</i> de Piezo2 . . . . .	97
Figure 18.	Immunohistochimie contre la protéine Piezo2 et la phalloïdine dans la peau du museau d’opossum à différents âges . . . . .	99
Figure 19.	Contrôle pour l’immunohistochimie de la phalloïdine . . . . .	100
Figure 20.	Présence d’ARNm de Piezo2 dans la tête complète d’opossums sans peau . . . . .	102
Figure 21.	Expression développementale de Piezo2 dans le système vestibulaire . . . . .	104
Figure 22.	Immunohistochimie contre l’actine dans les organes sensoriels du système vestibulaire . . . . .	107
Figure 23.	Contrôle négatif pour l’immunohistochimie Piezo2 . . . . .	109
Figure 24.	Développement de Piezo2 et des cils dans les cellules ciliées de la cochlée . . . . .	112
Figure 25.	Spécificité des anticorps dirigés contre Piezo2 . . . . .	114

### Chapitre 4 – Discussion

Figure 26.	Étapes du développement des cellules ciliées vestibulaires chez l’opossum ( <i>Monodelphis domestica</i> ) et la souris ( <i>Mus musculus</i> ) . . . . .	124
Figure 27.	Étapes du développement des cellules ciliées cochléaires chez l’opossum ( <i>Monodelphis domestica</i> ) et la souris ( <i>Mus musculus</i> ) . . . . .	127
Figure 28.	Début de la sensibilité au son chez différentes espèces de mammifères . . . . .	130
Figure 29.	Opossum <i>Monodelphis domestica</i> . . . . .	135



# Liste des tableaux

## Chapitre 1 - Introduction

Tableau 1.	Les canaux ioniques mécanosensibles chez les eucaryotes . . . . .	23
Tableau 2.	Comparaison approximative des stades de Carnegie pendant l'embryogenèse de l'humain, de la souris, du rat et de l'opossum . . . . .	38

## Chapitre 2 - Méthodologies

Tableau 3.	Amorces spécifiques utilisées dans les expériences en RT-PCR et Hybridation <i>in situ</i> . . . . .	89
Tableau 4.	Anticorps primaires et secondaires utilisés dans les expériences en immunofluorescence . . . . .	92

## Liste des sigles et abréviations

5G	Ganglion trigéminal
ARNm	ARN messenger
cDNA	ADN complémentaire
CED	Domaine extracellulaire C-terminal ou capuchon
CTD	Domaine C-terminal
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
DRG	Ganglion des racines dorsales (« <i>dorsal root ganglia</i> »)
E	Jour de développement embryonnaire
IHC	Cellule ciliée interne (« <i>inner hair cell</i> »)
LVe	Noyau vestibulaire latéral
MVe	Noyau vestibulaire médial
OHC	Cellule ciliée externe (« <i>outer hair cell</i> »)
P	Jour postnatal
RT-PCR	Transcription inverse-polymérisation en chaîne
SHH	Morphogène <i>sonic hedgehog</i>
SNC	Système nerveux central
SpVe	Noyau vestibulaire inférieur (spinal)
SuVe	Noyau vestibulaire supérieur

TMC1/2	Protéine transmembranaire de type canal 1 et 2
TRP	<i>Transient receptor potentiel</i>
Vm	Noyau moteur du trijumeau
Vmes	Noyau mésencéphalique du trijumeau
Vpr	Noyau principal du trijumeau
Vsp	Noyau spinal du trijumeau
WT	Type sauvage (« <i>wild-type</i> »)

## Remerciements

J'offre tous mes remerciements à mon directeur de recherche, Jean-François Pflieger. Je lui suis redevable de m'avoir acceptée dans son laboratoire, de m'avoir soutenue, encouragée et guidée dans ce travail. À mon sens, il a su trouver le parfait équilibre entre m'offrir un bon encadrement et me laisser assez de liberté afin d'explorer à ma guise différentes avenues.

Je remercie chaleureusement Thérèse Cabana, pour ses judicieux conseils dans mon rôle d'auxiliaire d'enseignement, ainsi que les nombreuses et agréables discussions que nous avons eues. Votre bonne humeur rayonne et motive les gens qui vous entourent.

Je remercie Annie Angers, Daniel Kierzkowski et les étudiants du laboratoire Kmita pour leur aide technique dans la réalisation de ce projet.

Je remercie de tout cœur mon grand-oncle Hubert Laforge, pour avoir initié ma passion pour la science. Je tiens également à remercier mon grand-père, Gilles Laforge, ainsi que ma grand-mère, Lise Pagé, pour leur amour, leur appui et leurs encouragements incessants.

Je n'aurais jamais pu réussir un tel projet sans le soutien inébranlable de Francis Feldman. Je lui serai toujours reconnaissante d'avoir eu la patience de me soutenir et de m'encourager sans relâche dans mes moments de doute. Je le remercie également pour son manque d'intérêt envers la neuroscience, ce qui m'a permis de maintenir une saine distance avec ma recherche dans mes temps libres et ainsi d'apprécier toutes les bonnes choses que la vie a à offrir.

Je remercie tendrement ma mère Louise Laforge, pour son soutien affectueux ainsi que sa ferme conviction que ce jour arriverait. Ta chaleur et tes douces pensées n'auront pas été en vain.

Ces remerciements seraient incomplets sans une pensée pour les quelque deux cent cinquante opossums sans lesquels cet ouvrage n'aurait pas été possible.

# Chapitre 1

## Introduction

*The brain is a complex biological organ possessing immense computational capability that constructs our sensory experience, regulates our thoughts and emotions and controls our actions.<sup>1</sup>*

– Eric Kandel (1929 – ), psychiatre et neurobiologiste

Cette thèse s’inscrit dans le cadre général d’un programme de recherche portant sur le développement sensorimoteur mammalien, en utilisant l’opossum *Monodelphis domestica* comme modèle expérimental. Chez cette espèce, comme chez les autres marsupiaux, les nouveau-nés sont très immatures à la naissance mais doivent atteindre une mamelle sur le ventre de leur mère et s’y accrocher pour survivre et se développer. Des études antérieures au laboratoire ont montré que le toucher au niveau de la peau faciale est une sensation bien développée chez les nouveau-nés, alors que le sens de l’équilibre suivrait de peu. Ces sens sont potentiellement impliqués dans les comportements sensorimoteurs précoces et pour mieux comprendre leurs fonctionnements et leurs rôles, nous nous sommes intéressés au substrat moléculaire sous-jacent. Ces derniers dépendent de cellules spécialisées appelées mécanorécepteurs qui ont la propriété de percevoir des déformations

---

<sup>1</sup> Kandel, 2013.

mécaniques des tissus et d'y répondre en déclenchant l'activation de fibres nerveuses. Cette propriété s'appelle mécanotransduction et est rendue possible par la présence de récepteurs moléculaires dans ces cellules. À l'exception de la famille des Piezo, peu de molécules ont été identifiées et caractérisées comme participant à la mécanotransduction chez les Vertébrés. Les Piezo se divisent en deux grandes sous-familles (Piezo1 et Piezo2) de canaux transmembranaires et ont été retrouvés dans une vaste gamme de cellules. Chez les mammifères matures, il est bien établi que Piezo2 est crucial pour le fonctionnement des mécanorécepteurs impliqués dans la perception du toucher, en plus d'être impliqué dans d'autres sens comme la vestibulation (sens de l'équilibre) et l'audition. Toutefois, aucune étude concernant Piezo2 n'existe pour les marsupiaux. Étant donné son importance pour la mécanotransduction, nous avons étudié la distribution de Piezo2 dans la tête d'opossums à différents âges postnataux afin d'évaluer si ce canal joue un rôle dans les comportements précoces de l'opossum.

Ce chapitre présente les principales notions anatomiques et physiologiques sur lesquelles repose cette thèse. La première section discute de quelques notions générales sur la mécanotransduction et l'implication des canaux ioniques mécanosensibles dans la perception sensorielle, suivies du fonctionnement détaillé des protéines cationiques Piezo1 et Piezo2. Les sections suivantes abordent plus spécifiquement trois systèmes sensoriels auxquels Piezo2 a été associé : le système du trijumeau, le système cochléaire et le système vestibulaire. L'anatomie et le développement fonctionnel de chaque système sera vu, ainsi que l'importance de Piezo2 au niveau des récepteurs sensoriels impliqués. Suit une description du modèle d'étude, l'opossum *Monodelphis domestica* et de certaines étapes clés de son développement sensorimoteur. Ce chapitre se termine par l'exposé des hypothèses de recherche et des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse.

## 1.1 La mécanotransduction

Les mécanorécepteurs sont des cellules sensorielles caractérisées par la capacité de modifier leur potentiel de repos suite aux déformations mécaniques de leur membrane. Cette propriété dépend de l'expression de protéines membranaires, canaux ioniques ou liés aux protéines G, et de leur localisation sur le mécanorécepteur. Lorsqu'une pression mécanique est exercée sur la membrane, elle provoque une déformation de ces protéines qui résultent en des entrées (excitations) ou sorties (inhibitions) de cations. Si un stimulus excitateur est suffisamment fort, il induira la genèse de potentiels d'action et la relâche de neurotransmetteurs par le mécanorécepteur. Cette transformation de stimuli mécaniques en signaux électrochimiques est appelée mécanotransduction et elle se retrouve dans de nombreux processus biologiques (Shepherd, 1994; Kandel et al., 2012 ch. 21). Par exemple, la sensation du toucher repose sur des mécanorécepteurs, tels que les cellules de Merkel et les corpuscules de Pacini, qui réagissent à des déformations mécaniques des tissus cutanés (McCarter et al., 1999). L'équilibre et l'audition dépendent des cellules ciliées situées dans l'oreille qui réagissent à des mouvements de leurs cils. La régulation de la pression sanguine fait intervenir des barorécepteurs qui décèlent les variations d'étirement ou de distension des vaisseaux sanguins.

### 1.1.1 Canaux ioniques mécanosensibles

Les canaux ioniques mécanosensibles sont une composante essentielle du processus de mécanotransduction. Il y a plus de 40 ans, des preuves électrophysiologiques ont démontré pour la première fois l'existence de canaux ioniques mécanosensibles (Corey et Hudspeth, 1979, 1983). Depuis, des études approfondies ont révélé une très large variété de canaux ioniques capables de détecter diverses formes de forces mécaniques chez les procaryotes (bactéries) et les eucaryotes (plantes, animaux) (Blount et al., 1999; Corey et Holt, 2016; Dror et Avraham, 2009). Le Tableau 1 donne une idée de la diversité des principales familles et isoformes des canaux mécanosensibles. Si la majeure partie de ces canaux sont retrouvés autant chez les invertébrés que chez les vertébrés, certains n'ont pas d'homologues chez les invertébrés (ex. les récepteurs ioniques de la famille des TRPN). Il peut aussi y avoir des variations entre classes comme pour la superfamille des DEG/ENaC ASIC qui ne sont pas conservées fonctionnellement chez les mammifères alors qu'ils le sont chez d'autres vertébrés (Delmas et al., 2011; Lumpkin et al., 2010). Certains de ces canaux sont multimodaux, comme un bon nombre des canaux de la famille des TRP, qui sont non seulement activés par des stimuli mécaniques, mais aussi par des stimuli chimiques et thermiques ( $> 27-34\text{ °C}$ ) (Güler et al., 2002). La diversité des propriétés des canaux mécanosensibles fait en sorte qu'une description exhaustive dépasserait le cadre de cette thèse. Nous nous concentrons donc sur ceux dont l'importance des propriétés physiologiques et fonctionnelles chez les mammifères a été mise en évidence par de nombreuses études récentes : la famille des Piezo.



**Tableau 1.** Les canaux ioniques mécanosensibles chez les eucaryotes. Inspiré de Fang et al. 2021

<b>Famille des canaux</b>	<b>Isoforme du canal</b>	<b>Références</b>
Canaux TRP	TRPA1	Brierley et al., 2011
	TRPC1	Maroto et al., 2005
	TRPC6	Spassova et al., 2006
	TRPV1	Feng et al., 2008
	TRPV4	Liedtke et al., 2005
	TRPM4	Morita et al., 2007
	TRPM7	Numata et al., 2007
	TRP4	Kang et al., 2010
	TRPP2	Berrout et al., 2012
Canaux voltage-dépendants K <sup>+</sup>	Shaker (Kv1.1)	Hao et al., 2013
	Ca <sup>2+</sup> - activated K <sup>+</sup> (BK)	Zhao et Sokabe, 2008
	TREK1/2	Maingret et al., 1999
	TRAAK	Brohawn et al., 2012
	HCN2	Lin et al., 2007
Canaux voltage-dépendants Na <sup>+</sup>	Nav1.5	Beyder et al., 2010
Canaux voltage-dépendants Ca <sup>2+</sup>	L-type	Kraichely et al., 2009
	N-type	Calabrese et al., 2002
	T-type	Hilaire et al., 2012
Canaux voltage-dépendants Cl <sup>-</sup>	CFTR	Zhang et al., 2010
Famille protéine OSCA	<i>SsCSC1</i> , <i>HsCSC1</i>	Hong et Driscoll, 1994
Superfamille DEG/eNaC	<i>C.elegans</i> MEC (MEC-4, MEC-10)	Arnadottir et al., 2011
	ASIC	Mcllwraith et al., 2005
Canaux Piezos	Piezo1	Coste et al., 2010
	Piezo2	Coste et al., 2010
Autres	TMC1/2	Pan et al., 2013

## 1.2 Famille des Piezo : Piezo1 et Piezo2

Récipiendaire du prix Nobel de Physiologie et Médecine en 2021, le Dr. Ardem Patapoutian a révélé une nouvelle famille de canaux cationiques activés mécaniquement chez les mammifères, composée des canaux Piezo1 et Piezo2. Depuis leur découverte en 2010, des gènes orthologues ont été identifiés chez plusieurs espèces d'eucaryotes dont certains protozoaires (Prole et Taylor, 2013), la drosophile (Kim et al., 2012), la souris (Kamajaya et al., 2014) et l'humain (Coste et al., 2010, 2012). Aucun homologue n'a cependant été identifié chez les bactéries et les levures.

### 1.2.1 Structure et mécanisme d'action

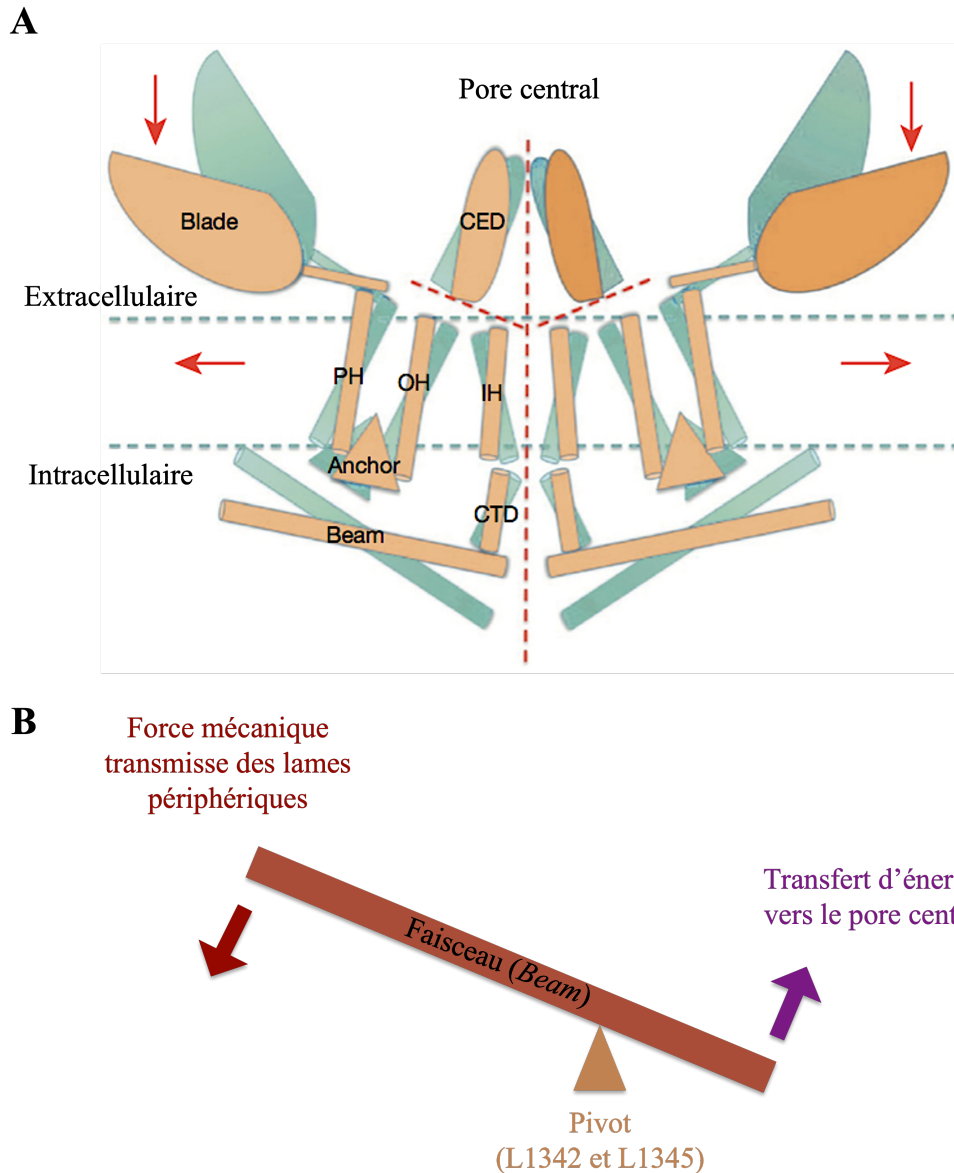
Chez les vertébrés, les deux isoformes Piezo1 et Piezo2 sont formées d'environ 2 500 et 2 800 acides aminés respectivement. Ces protéines agissent comme des canaux cationiques non sélectifs perméables aux ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et au  $\text{Mg}^{2+}$  avec une légère préférence pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (Coste et al., 2010, 2012). La structure complexe des canaux Piezo2 leur permet de transformer les stimuli mécaniques en signaux électrochimiques en laissant entrée et sortir ces cations.

Plus précisément, des études chez la souris ont révélé que le canal ionique Piezo1 a une structure composée de trois unités (homotrimérique) de type hélice (Coste et al., 2012, 2015). Chaque unité comprend un domaine intracellulaire formé par trois faisceaux d'une longueur de 90nm qui sont orientés à un angle de  $30^\circ$  par rapport à la membrane. En plus d'offrir une base structurelle à la transmission mécanique (Zhao et al., 2018), ces faisceaux relient les domaines extracellulaires subdivisés en trois lames périphériques et un pore central conducteur d'ions recouvert d'un capuchon (CED). Ces structures entourent les 38 hélices transmembranaires désignées comme hélice interne, hélice externe et hélice périphérique qui servent à former la paroi du pore ionique central (Fig. 1A) (Guo et MacKinnon, 2017; Saotome et al., 2018).

La structure globale du canal Piezo2 est très similaire à celle de Piezo1, c'est-à-dire un assemblage homotrimérique comprenant un module de pore central formé par des hélices, et permettant le passage des ions, ainsi que trois lames périphériques (28 nm de diamètre et 10 nm de profondeur) et trois faisceaux (9 nm de longueur) (Taberner et al., 2019). Il a été démontré que Piezo2 possède également 38 hélices transmembranaires, ce qui représente au total 114 hélices quand on tient compte des trois unités. Un total qui fait des Piezos les protéines avec le plus d'éléments transmembranaires parmi celles recensées. Cependant, les canaux Piezo1 et Piezo2 partagent seulement  $\sim 42\%$  d'homologie de séquence, ce qui entraîne de nombreuses différences morphologiques et fonctionnelles. Par exemple, les hélices internes qui bordent le pore central du canal Piezo2 possèdent des résidus d'acides aminés supplémentaires en haut CED (L2743) et en bas CTD (V2750, F2754 et E2757) qui lui permettent de se refermer entièrement au repos. Par contraste, le pore central de Piezo1 demeure partiellement ouvert (Wang et al., 2019).

La sélectivité du pore Piezo1 et Piezo2 est possible grâce aux différentes composantes qui les forment. À son ouverture au niveau du CED, on retrouve des acides aminés chargés négativement nommés DEEED (2393-2397) qui assurent une conduction ionique efficace en favorisant le passage de cations et empêchent celui des anions (Jasti et al., 2007). Sous le CED, le canal de conduction ionique est bordé par les hélices internes dont les résidus d'acides aminés sont principalement hydrophobes, ce qui repousse les molécules d'eau et assure l'étanchéité du canal. De plus, deux acides aminés (E2495 et E2496) localisés à la base du pore central (CTD) expliquent l'affinité pour le calcium en permettant une sélectivité des ions calcium (Wang et al., 2019; Zhao et al., 2018).

La mécanotransduction débute chez les Piezos par une pression appliquée sur les lames périphériques incurvées (flèches rouges verticales, Fig. 1A). Cette pression courbe les lames dans le sens des aiguilles d'une montre et étire la membrane dans laquelle elles résident. Cela entraîne à son tour un déplacement latéral des portions transmembranaires, le tout résultant en une légère ouverture du pore central (flèche rouge horizontale, Fig. 1A) (Lewis et Grandl, 2015). Le déplacement des lames a aussi pour conséquence le mécanisme de type levier des faisceaux. En déformant la membrane autour du pore central, elles transmettent une partie de la force mécanique externe aux faisceaux intracellulaires. Le pivot, formé par les résidus d'acides aminés leucine L1342 et L1345, assure la transmission mécanique jusqu'à la base CTD du pore central (Fig. 1B). Les effets synergiques des lames et des faisceaux entraînent donc une ouverture du pore central permettant le passage des cations, convertissant ainsi les pressions en mouvements ioniques (Cox et al., 2016; Ge et al., 2015; Anderson et al., 2017).



**Figure 1. Conformation et activation des protéines Piezos chez la souris.** (A) Modèle structurel des canaux Piezo. Le modèle en vert représente le canal au repos. Lorsqu'une pression est exercée sur les lames, cela entraîne un changement de conformation à l'état ouvert en jaune résultant en un écartement des CED et une ouverture du pore central. Les lignes pointillées rouges indiquent les voies de conduction ionique possibles en réponse à des stimuli (flèches rouges). (B) Modèle du mécanisme de type levier des faisceaux. Les flèches rouge et violette indiquent respectivement les forces d'entrée et de sortie. Blade : lame périphérique, CED : domaine extracellulaire C-terminal ou « capuchon », CTD : domaine C-terminal qui forme le plancher du pore central, IH : hélice interne, OH : hélice externe, PH : hélice périphérique, Anchor : domaine d'ancrage, Beam : faisceaux. (Adapté de Ge et al., 2015)

## 1.2.2 Localisation tissulaire et cellulaire

Comme il s'agit de molécules identifiées assez récemment (Coste et al., 2010), il existe encore de nombreuses incertitudes quant à la distribution exacte de Piezo1 et Piezo2 dans les différents tissus des vertébrés. Toutefois, il a été montré que Piezo1 et Piezo2 contribuent à de multiples processus physiologiques importants (Fig. 2).

Le canal Piezo1 est généralement présent dans les tissus non sensoriels, avec une forte expression au niveau de l'endothélium pulmonaire qui est exposé à des contraintes mécaniques dues aux variations de pressions alvéolaires et hydrostatiques (Gudipaty et al., 2017). Dans le système urinaire, Piezo1 procure à différents types de cellules épithéliales la capacité de réagir aux variations du flux urinaire au niveau des reins, de l'uretère, de la vessie et de l'urètre (Rodat-Despoix et Delmas, 2009; Weinbaum et al., 2010).

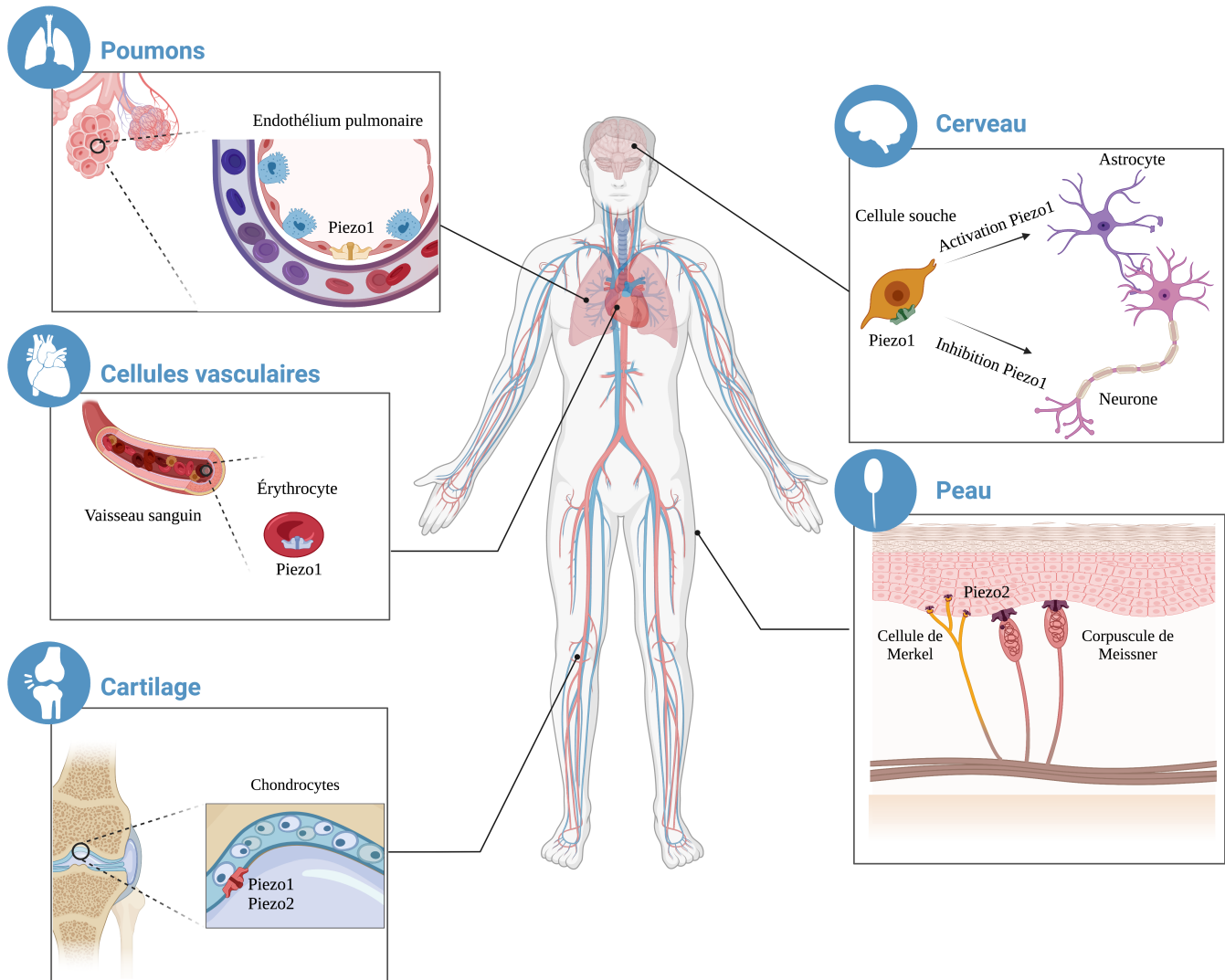
Dans le système cardiovasculaire, le débit sanguin influence la maturation cellulaire des cellules endothéliales qui expriment Piezo1 (Ranade et al., 2014a; Rhode et al., 2017). Piezo1 est aussi impliqué dans le remodelage vasculaire pendant l'angiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants (Cinar et al., 2015; Kang et al., 2019; Retaillieu et al., 2015). De plus, Piezo1 semble jouer un rôle dans l'activité des érythrocytes en régulant leur volume homéostatique (Andolfo et al., 2013; Cahalan et al., 2015; Faucherre et al., 2014; Zarychanski et al., 2012).

Dans le système nerveux central (SNC), les cellules souches neurales ont la capacité de se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Gonzalez et al., 2016; Sacco et al., 2018; Sun et al., 2012; Watt et Huck, 2013). Chez l'humain, l'activation de Piezo1 déclenchée par les forces mécaniques appliquées sur des cellules souches en culture conduit au développement de neurones (Velasco-Estevez et al., 2020), tandis que son inhibition mène au développement

d'astrocyte (Pathak et al., 2014). Le canal Piezo1 jouerait donc un rôle dans la différenciation des cellules souches neurales vers un phénotype neuronal ou astrocytaire.

Le canal Piezo2 a principalement été observé au niveau des tissus sensoriels, particulièrement au niveau des neurones sensoriels ganglionnaires. Il joue un rôle important dans la perception du toucher léger au niveau de la peau par des terminaisons sensorielles de récepteurs tactiles comme les corpuscules de Meissner et celles qui innervent les cellules de Merkel (Maksimovic et al., 2014; Ranade et al., 2014b; Woo et al., 2014). Piezo2 procure des propriétés mécanosensibles à d'autres types de cellules sensorielles comme les propriocepteurs, retrouvés dans les muscles ou au niveau des articulations (Woo et al., 2015). Malgré le fait que la nociception mécanique ne dépendrait que partiellement de ce canal ionique, il serait impliqué dans des cas d'allodynie mécanique, soit une douleur générée par des stimuli tactiles inoffensifs (Murthy et al., 2018; Zhang et al., 2019). De plus, l'expression du canal Piezo2 a également été identifiée au niveau de l'urothélium de la vessie, où il permet la détection d'étirement et les réflexes de miction (Marshall et al., 2020). Ce canal est aussi retrouvé dans des cellules qui ne sont pas d'origine nerveuse, mais sont associées à des fibres nerveuses comme les cellules de Merkel de l'épiderme ou les cellules ciliées de l'oreille interne.

Finalement, les canaux Piezo1 et Piezo2 ne sont pas nécessairement mutuellement exclusifs. Par exemple, dans le cartilage articulaire, les chondrocytes expriment simultanément Piezo1 et Piezo2 à la suite de lésions du cartilage induites par des contraintes mécaniques élevées (Lee et al., 2014).



**Figure 2. Localisation des canaux Piezos dans le corps humain.** Quelques exemples de cellules exprimant l'une ou l'autre des isoformes de Piezo, ou les deux.



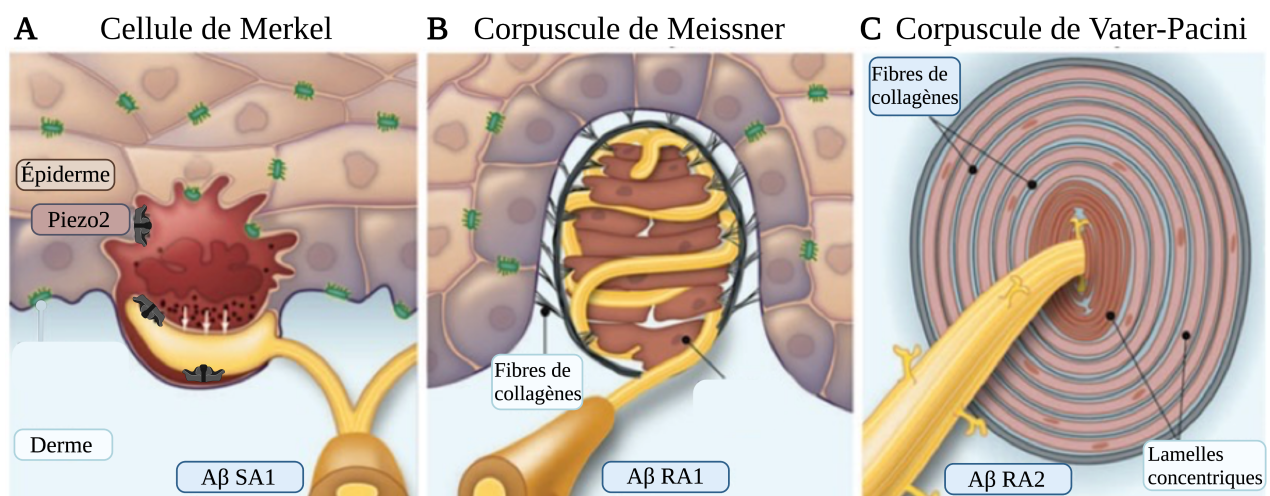
### 1.3 Tégument et sens du toucher

La peau ou tégument est un organe recouvrant l'organisme, composé de deux principales couches histologiques (épiderme et derme), où se distribuent des récepteurs sensoriels associés à différentes modalités. Le sens du toucher repose sur des neurones sensoriels qui réagissent à des stimulations mécaniques peaucières, c'est-à-dire des déformations, mouvements, étirements et vibrations affectant la peau. Les corps cellulaires de ces neurones se trouvent dans les ganglions des racines dorsales (DRG) de la moelle épinière et des nerfs crâniens (Rice et Albrecht, 2008 ; Kandel et al., 2012 ch.22-23; Abaira et Ginty, 2013). Ces neurones ont une morphologie pseudo-unipolaire, avec un prolongement central se terminant dans des noyaux du SNC et un prolongement périphérique se terminant dans le derme ou l'épiderme de la peau ou encore étant étroitement associés aux phanères (poils, ongle, etc.). Chaque type neuronal est classé physiologiquement selon ses réponses à des stimulations tactiles spécifiques : par exemple, les mécanorécepteurs à haut seuil (HTMR) relaient le toucher douloureux et les mécanorécepteurs à bas seuil (LTMR) relaient le toucher non douloureux (Zimmerman et al., 2014).

Les fibres périphériques se terminent par les régions réceptrices à proprement parler, qui se subdivisent en deux grandes familles : les terminaisons encapsulées, ou corpuscules, et les terminaisons nues. Les premières possèdent une capsule fibreuse généralement formée par des cellules de Schwann et les cellules du tissu conjonctif, principalement les fibroblastes, qui entourent une fibre nerveuse de fort calibre (fibres dites  $A\beta$ ). Les principaux corpuscules sont le corpuscule de Meissner, celui de Pacini (ou Vater-Pacini), et celui de Ruffini. Le premier (Fig.3B) se retrouve dans les crêtes dermiques qui sous-tendent l'épiderme et s'insinuent dans celui-ci en dessinant des sillons réguliers : les papilles dermiques. Le corpuscule de Meissner se trouve dans des zones particulièrement sensibles, comme la paume des mains. Sa localisation ainsi que sa

morphologie lui permettent de détecter de légères pressions cutanées. Le corpuscule de Vater-Pacini (Fig. 3C) est une grande structure – son diamètre peut aller jusqu’à 2mm chez l’humain – comprenant de nombreuses lamelles concentriques qui lui donnent une apparence en tranche d’oignon sur coupe histologique. Il est sensible à la vibration et est généralement localisé dans le derme profond ou l’hypoderme. Le corpuscule de Ruffini (non illustré) a une structure en forme de fuseau moins dense que pour les mécanorécepteurs précédents. Il est étroitement relié à la matrice de collagène de la couche réticulaire du derme, ce qui le rend particulièrement sensible à l’étirement de la peau (Feito et al., 2018; García-Piqueras et al., 2019; Johnson, 2001).

Les terminaisons nues sont de différents calibres, de petit (fibre C) à grand (fibre A $\beta$ ), et elles se distribuent largement dans le derme et l’épiderme. La morphologie générale des fibres nerveuses à terminaisons nues mécanosensorielles ne permet pas de les distinguer des fibres associées à d’autres modalités sensorielles (nociception, thermoception, etc.). Un cas particulier d’innervation à terminaisons nues est le complexe de Merkel (Fig. 3A), qui comprend une fibre de fort calibre



**Figure 3. Trois mécanorécepteurs et de leurs terminaisons afférentes. (A) Complexe de Merkel avec la localisation du canal Piezo2 (noir), (B) Corpuscule de Meissner et (C) Corpuscule de Vater-Pacini avec leurs fibres respectives. (Adapté de Zimmerman et al., 2014).**

(A $\beta$ ) innervant une ou plusieurs cellules spécialisées, les cellules de Merkel, se trouvant dans la couche germinative épidermique (Moll et al., 2005). Autant la fibre que les cellules sont sensibles à des pressions fines s'exerçant de manière localisée sur l'épiderme (Diamond et al., 1988; Maricich et al., 2009).

Comme décrit plus haut, les neurones mécanorécepteurs possèdent aussi un des prolongements centraux. Ces derniers transmettent l'information nerveuse à des neurones localisés soit dans la moelle épinière, pour les mécanorécepteurs qui innervent le corps en général, soit dans des noyaux du tronc cérébral, pour ceux qui innervent la peau de la tête (Shankland, 2000). Le principal nerf sensoriel innervant la peau faciale est le nerf du trijumeau.

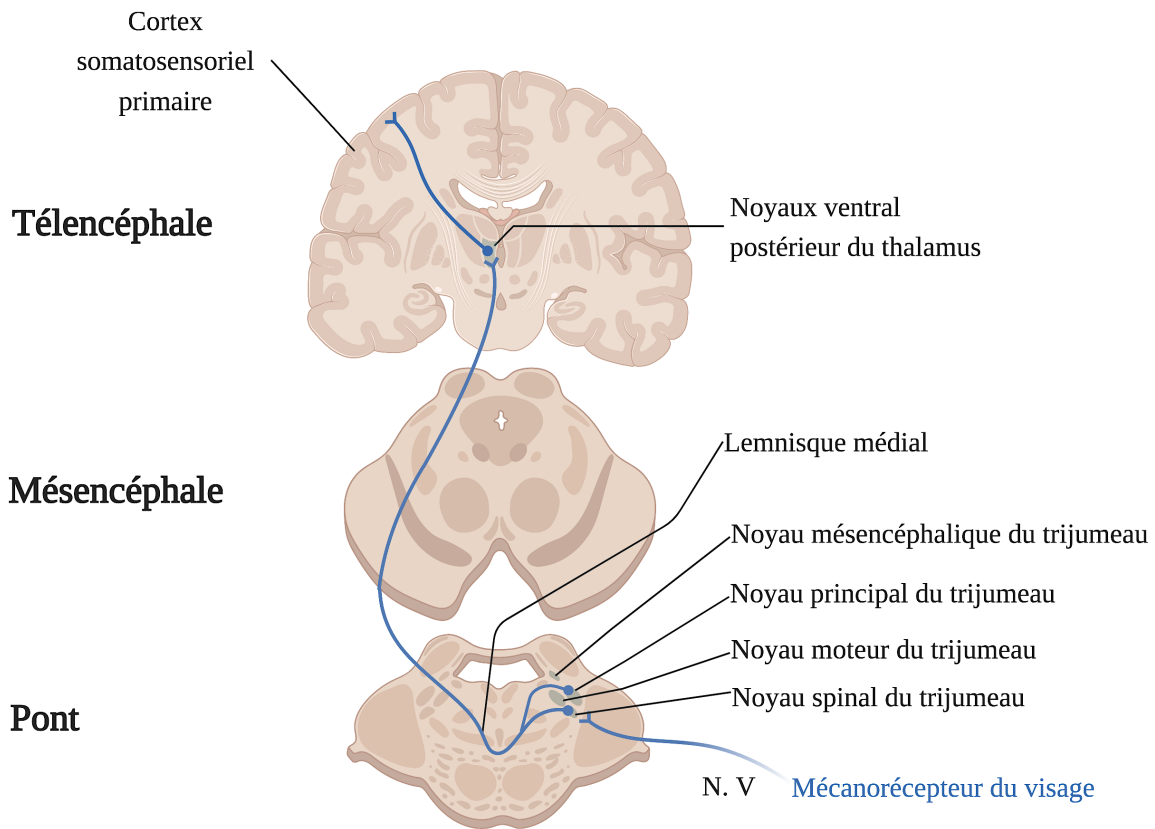
### **1.3.1 Système du trijumeau**

Le nerf du trijumeau (5N ou V) est le cinquième nerf crânien. Il doit son nom au fait qu'il se ramifie en trois branches en périphérie du ganglion trigéminal (5G), aussi appelé ganglion semi-lunaire ou de Gasser : la branche ophtalmique, la maxillaire et la mandibulaire. Les fibres nerveuses qui composent ces branches sont notamment responsables de l'innervation des muscles masticateurs au travers de la branche mandibulaire, mais surtout de l'innervation sensorielle de la face et d'une grande partie des cavités nasales et buccales via les trois branches. Les afférences sensorielles du nerf forment, centralement, le faisceau spinal du trijumeau qui suit les noyaux du complexe sensoriel du trijumeau qui forment une colonne plus ou moins continue de la corne dorsale de la moelle épinière jusqu'au mésencéphale (Shankland, 2000).

Chez tous les mammifères, quatre principaux noyaux du tronc cérébral sont associés au système du trijumeau : trois sensoriels afférents – de caudal vers rostral ; n. trijumeau spinal (Vsp), n.

trijumeau principal (Vpr) et n. trijumeau mésencéphalique (Vmes) – en plus du noyau moteur du trijumeau (Vm) efférent (Fig. 4) (Capra et Dessem, 1992 ; Waite et al., 1994 ; Ashwell et al., 2006). Le noyau mésencéphalique du trijumeau est composé de neurones sensoriels responsables de l'innervation proprioceptive des muscles masticateurs (ex., m. masseter et temporal) et le noyau moteur contient les motoneurones activant ces mêmes muscles, plus quelques autres, tel que le muscle tenseur du tympan. Le noyau Vsp est principalement innervé par des afférences relayant des inputs sur la douleur, la température, le toucher grossier provenant du visage et des muqueuses nasales et buccales. Les fibres nerveuses sensorielles qui se terminent au niveau du noyau Vpr sont principalement des récepteurs cutanés sensibles à la pression et au toucher exercés sur la peau (Olszewsky, 1950).

La principale voie efférente issue des noyaux sensoriels Vsp et Vpr est la voie trigéminal ventrale (Fig. 4). Celle-ci relaie les informations sensorielles vers la portion médiale du noyau ventral postérieur du thalamus. Les neurones de ce noyau projettent leurs axones vers le cortex somatosensoriel primaire. Cette voie est la principale source d'informations sensorielles conscientes de la face. Les noyaux sensoriels du trijumeau sont à l'origine d'autres systèmes de projection servant à influencer les comportements en fonction des inputs sensoriels faciaux. Ils influencent notamment l'activité de la moelle épinière principalement via des projections vers des neurones réticulospinaux.



**Figure 4. Principale voie trigéminal centrale des mécanorécepteurs du visage chez les mammifères.** Le schéma situe approximativement la localisation des quatre principaux noyaux du trijumeau au niveau du tronc cérébral ainsi que la voie trigémino-thalamique ventrale qui relais les inputs sensoriels faciaux vers le thalamus puis vers le cortex somatosensoriel primaire.

### 1.3.2 Piezo2 et récepteurs cutanés

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études ont porté sur la distribution de la protéine Piezo2 dans les DRG ainsi que leurs récepteurs cutanés associés chez plusieurs espèces. Cette protéine se retrouve principalement dans les projections périphériques associées aux corpuscules de Meissner, mais aussi dans les terminaisons nues dont celles associées aux cellules de Merkel (Maksimovic et al., 2014; Ranade et al., 2014b; Woo et al., 2014). Il a été démontré que les canaux Piezo2 étaient impliqués dans la mécanotransduction de la mouche drosophile et du poisson-zèbre (Kim et al., 2012 ; Faucherre et al., 2013).

Chez la souris adulte, plusieurs tests ont comparé des spécimens sauvages (WT) qui expriment Piezo2 et d'autres où l'expression protéique a été inhibée par modification transgénique. Par exemple, des tests comportementaux réalisés sur des souris transgéniques n'exprimant pas Piezo2 ont montré un déficit presque complet de la sensation du toucher léger (Ranade et al., 2014b). Une de ces expériences était un test de préférence à deux choix, où les souris avaient l'option de se déplacer sur une plateforme dont une moitié était en mouvement et l'autre était immobile. Dans ce contexte, les souris WT évitaient systématiquement le côté mobile, tandis que les souris qui n'exprimaient pas Piezo2 n'ont montré aucune préférence. De plus, à l'aide de cultures cellulaires des neurones DRG de souris transgéniques et WT, des enregistrements électrophysiologiques ont démontré une abolition de la capacité à convertir les pressions en courants dépolarisants en l'absence de Piezo2 (Zhang et al., 2019). Des enregistrements similaires sur des préparations *ex vivo* de nerf saphène et de peau ont permis d'établir une corrélation entre cette perte de courants chez les souris transgéniques et une forte diminution de la mécanosensibilité des fibres sensorielles qui innervent les terminaisons nues des cellules de Merkel (Ranade et al., 2014b). Finalement, la présence de Piezo2 a été confirmée dans les cellules de Merkel et dans les terminaisons nerveuses

qui les innervent (Maricich et al., 2012; Woo et al., 2014). Ces études montrent que la mécanotransduction du complexe de Merkel dépend fortement de Piezo2 chez la souris adulte. Néanmoins, pratiquement aucune étude ne traite de l'importance du canal Piezo2 lors du développement de la peau chez les mammifères. Une seule étude, réalisée chez l'humain, s'y intéresse et démontre une immunoréactivité positive pour Piezo2 dès 13 semaines de gestation pour les cellules de Merkel, à partir de 23 semaines dans les axones terminaux des corpuscules de Pacini et à 36 semaines dans le cas des corpuscules de Meissner. Cette expression de Piezo2 est observée chez tous les individus étudiés, même chez ceux âgés de 20 ans (García-Mesa et al., 2022). Malgré tout, nous ne connaissons pas les répercussions précoces de la protéine Piezo2 chez les euthériens immatures, et aucune donnée n'existe chez les marsupiaux.

### **1.3.3 Développement du système du trijumeau**

Afin de comparer les étapes de développement, il a été proposé de se rapporter à la taille des embryons plutôt qu'à leur âge, puisqu'elle offre un meilleur point de comparaison entre les espèces euthériennes et marsupiales (Ashwell, 2015). Par exemple, à la naissance, le rat et la souris montrent des vibrisses qui émergent à l'extérieur de l'épiderme, ce qui correspond au stade 6 sur 8 que compte l'échelle de développement des poils de Hardy (Davidson et Hardy, 1952 ; Van Exan et Hardy, 1980) à la naissance, soit l'émergence des vibrisses à l'extérieur de l'épiderme (Ashwell, 2015). Le même principe s'applique lors d'étude embryologique avec les stades de Carnegie (voir tableau 2). Le développement morphologique interne et externe, comme le nombre de somites et la longueur de l'embryon, est comparé afin d'établir des corrélations entre les stades embryonnaires de différentes espèces.

**Tableau 2.** Comparaison approximative des stades de Carnegie pendant l’embryogenèse de l’humain, de la souris, du rat et de l’opossum. Les chiffres dans les colonnes sous les espèces sont en jours embryonnaires ou postnataux (P).

<b>Stade Carnegie</b>	<b>Humain<sup>1</sup></b>	<b>Souris<sup>2</sup></b>	<b>Rat<sup>3</sup></b>	<b>Opossum<sup>4</sup></b>
<b>1</b>	1	1	1	3
<b>2</b>	2-3	2	3.5	4
<b>3</b>	4-5	3	4-5	5
<b>4</b>	5-6	4.5	5	6.5
<b>5</b>	7-12	5	6	7
<b>6</b>	13-15	6	7.5	8
<b>7</b>	15-17	7	8.5	9
<b>8</b>	17-19	8	9	10
<b>9</b>	20	9	10.5	11
<b>10</b>	22	9.5	11	11.5
<b>11</b>	24	10	11.5	12
<b>12</b>	28	10.5	12	12.5
<b>13</b>	30	11	12.5	13
<b>14</b>	33	11.5	13	13.5
<b>15</b>	36	12	13.5	14
<b>16</b>	40	12.5	14	
<b>17</b>	42	13	14.5	P0
<b>18</b>	44	13.5	15	P0.5
<b>19</b>	48	14	15.5	P1
<b>20</b>	52	14.5	16	P1.5
<b>21</b>	54	15	16.5	P2
<b>22</b>	55	15.5	17	P2.5
<b>23</b>	58	16	17.5	P3

<sup>1</sup>O’Rahilly, 1979

<sup>2</sup>Otis et Brent, 1954

<sup>3</sup>Witschi, 1962

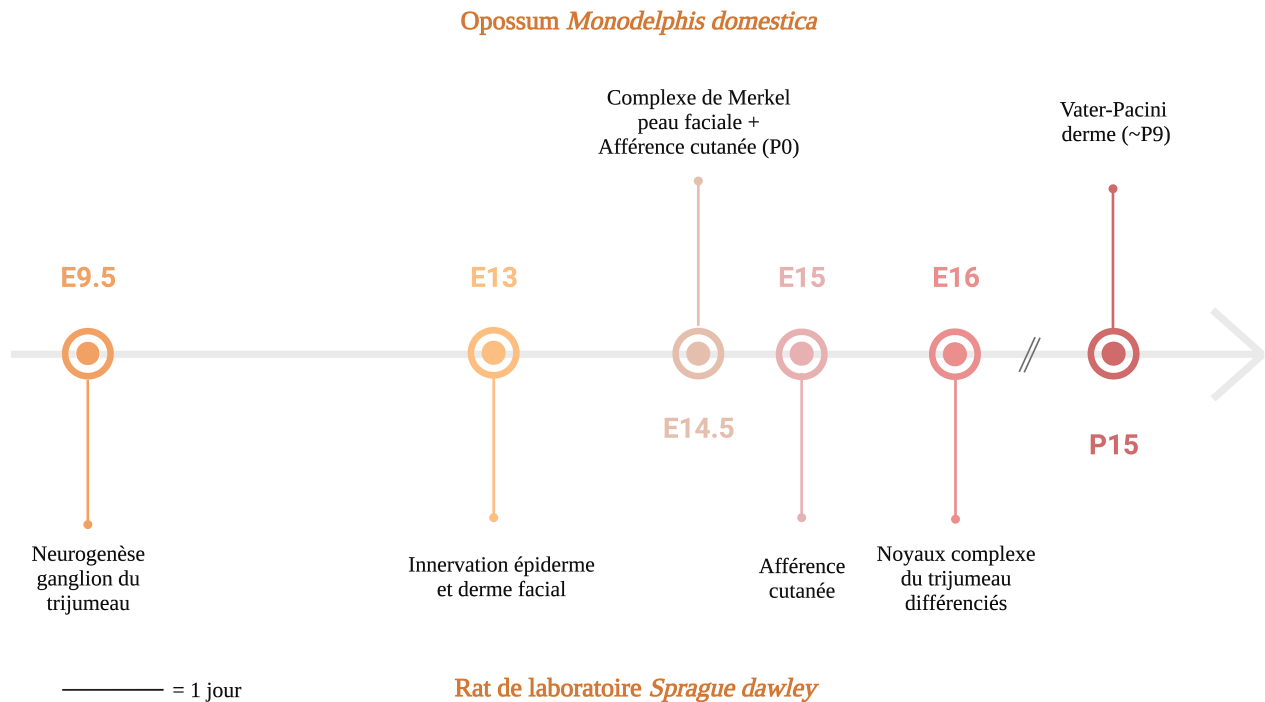
<sup>4</sup>Ashwell, 2015



Le développement du système du trijumeau est particulièrement bien documenté dans la littérature chez le rat embryonnaire. La neurogenèse du ganglion trigéminal (5G) débute vers le jour embryonnaire (E) 9.5, mais la plupart des neurones ganglionnaires de gros volume terminent leur division finale à E12 suivis des plus petits neurones à E13 (Forbes et Welt, 1981; Rhoades et al., 1991). À E11, le 5G ressemble à un amas de cellules mitotiques alors qu'il apparaît sous la forme d'un groupe cellulaire distinct situé entre l'œil et le myélocéphale avec des projections périphériques rayonnant dans la direction de leurs cibles éventuelles à E12 (Erzurumlu et Killackey, 1983). Les prolongements périphériques du 5G se différencient et atteignent leurs cibles vers E13, comme les papilles dermiques, les follicules pileux des futures vibrisses, l'épiderme et le derme où se trouvent les cellules de Merkel (Erzurumlu et Killackey, 1983; Van Exan et Hardy, 1980). Ces cellules sont identifiables à E16.5 chez la souris (Jenkins et al., 2019) et sont particulièrement abondantes dans le museau de marsupiaux nouveau-nés (Fig. 5) (Jones et Munger, 1985 ; Gemmell et al., 1988).

La différenciation des noyaux du complexe du trijumeau se produit entre E13 et E16 chez le rat (Altman et Bayer, 1980a, b, c; Erzurumlu et Jhaveri, 1992). Les prolongements centraux du 5G atteignent le tronc cérébral et se distribuent dans les différents noyaux peu après (Al-Ghoul et Miller, 1993). Les afférences trigéminales déclenchent des réponses dans les noyaux trigéminaux à partir de E15 (Waite et al., 2000). La transmission des influx trigéminaux vers la moelle épinière se fait soit directement au travers des neurones trigéminospinaux situés dans le noyau spinal, soit indirectement au travers de projections trigémino-réticulospinales. Le développement précis de celles-ci n'a pas été étudié à notre connaissance, mais elles s'établissent assez précocement. Par exemple, chez l'opossum *Monodelphis domestica*, des stimulations mécaniques et thermiques appliquées sur le museau entraînent des mouvements bilatéraux et synchronisés des membres

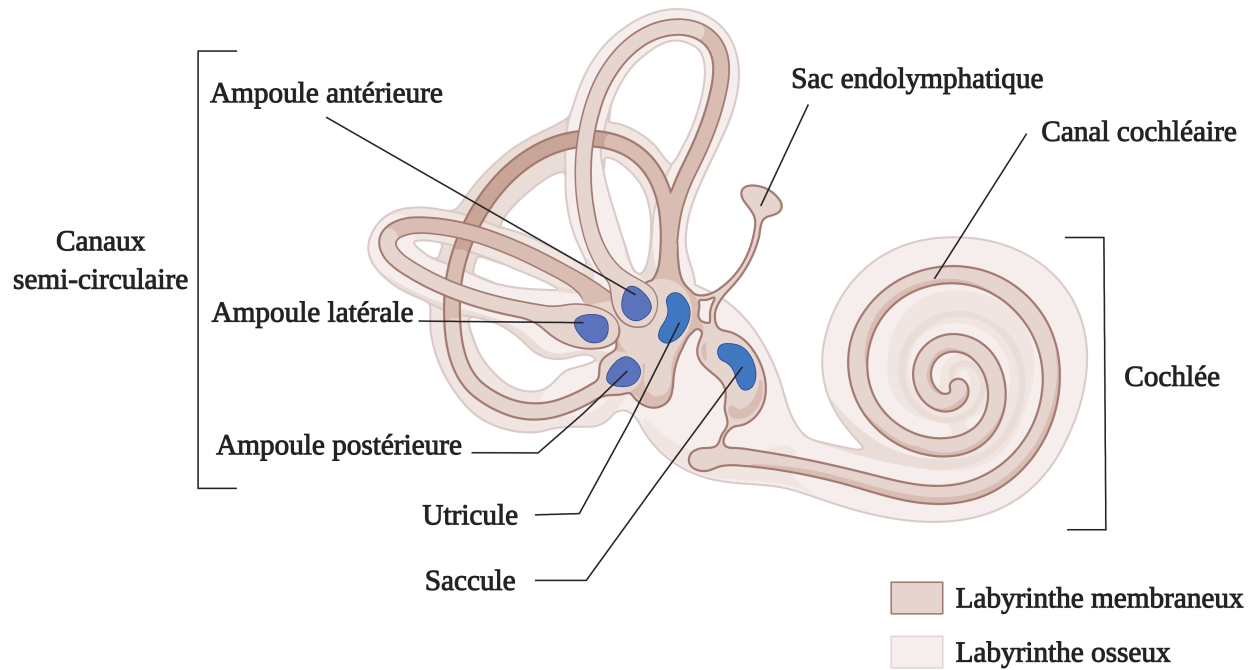
antérieurs dès la naissance (Corriveau-Parenteau et al., 2019; Desmarais et al., 2016). Ces résultats indiquent que le système trigéminal est au moins partiellement fonctionnel à des âges précoces et qu'il influence la motricité spinale (Adadja et al., 2013; Desmarais et al., 2016).



**Figure 5. Étapes du développement du système du trijumeau chez l’opossum (*Monodelphis domestica*) et le rat de laboratoire (*Sprague dawley*).** L’échelle temporelle présente les âges embryonnaires (E) et postnataux (P) où certaines étapes de développement se produisent chez le rat (en bas). Les âges auxquels se produisent les étapes connues sont donnés entre parenthèses chez l’opossum (en haut) (Jones et Munger, 1985 et observation personnelle) et sont rapportés à des âges comparables chez le rat. Barre d’échelle, 1 jour.

## 1.4 Oreille interne

La morphologie de l'oreille interne est complexe, comprenant une série de canaux et de lacunes dans la cavité de l'os temporal désignée par le terme de labyrinthe (Kandel et al., 2012 ch.30). On distingue le labyrinthe osseux, externe, dans lequel se déploie le labyrinthe membraneux dont la morphologie est légèrement différente du labyrinthe osseux. En raison de la différence de taille entre les labyrinthes osseux et membraneux, il y a un espace entre les deux structures qui est rempli d'un fluide appelé périlymphe similaire en composition ionique à celle du liquide cébrospinal. La lumière du labyrinthe membraneux contient un autre fluide connu sous le nom d'endolymphe dont la composition ionique unique est très enrichie en potassium (Couloigner et al., 1999 ; Kahle et Frotscher, 2002). Le labyrinthe membraneux s'étend jusqu'à former le canal et le sac endolymphatique. Comme son nom l'indique, le labyrinthe membraneux est délimité par une membrane épithéliale, généralement simple et fine, mais qui s'épaissit au niveau des organes sensoriels en un épithélium stratifié constitué de cellules de soutien et de cellules ciliées. Chez les mammifères, ces organes sont au nombre de six : cinq vestibulaires – la macule sacculaire, la macule utriculaire, et les trois crêtes ampullaires – et l'organe de Corti, cochléaire (Fig. 6). Les récepteurs sensoriels sont des cellules ciliées qui doivent leur nom à la présence de longues microvillosités apicales appelées stéréocils. Ces derniers supportent les canaux ioniques mécanosensibles et ont la forme d'un cylindre dont le cytosquelette est formé de filaments d'actines liés ensemble par des protéines. Les stéréocils sont agencés en rang selon une formation triangulaire où on note une augmentation de la hauteur des cils vers une pointe du triangle. Les cellules ciliées vestibulaires et les cellules ciliées cochléaires immatures, mais pas les cellules auditives matures (Pujol et al., 1998), possèdent un cil spécialisé à cette pointe : le kinocil, qui est structurellement plus proche d'un flagelle que d'une microvillosité (Hillman, 1969).

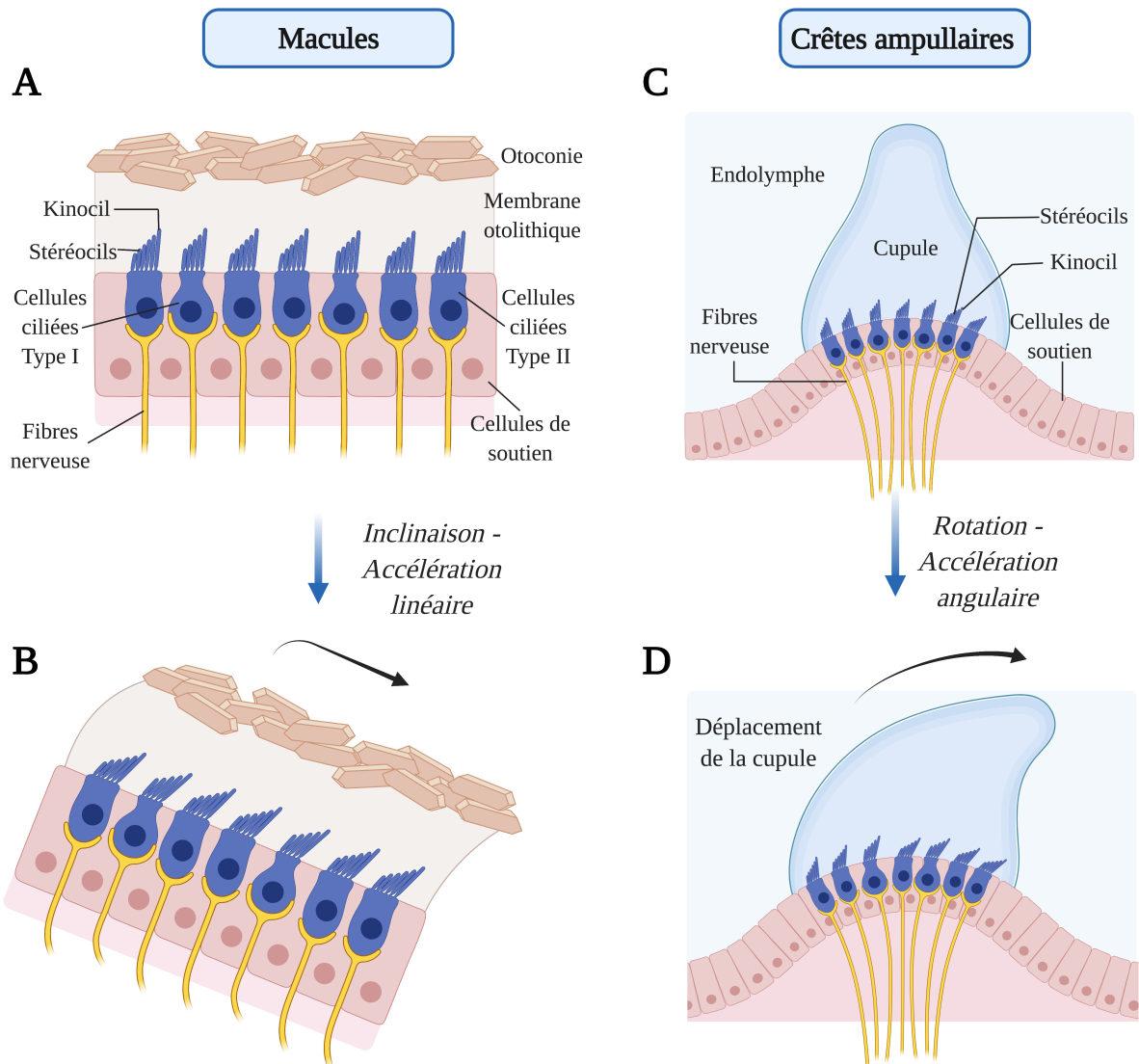


**Figure 6. Oreille interne.** Une représentation schématique du labyrinthe osseux dans lequel se trouvent les structures du labyrinthe membraneux qui régissent l'équilibre (saccule, utricule et canaux semi-circulaires) ainsi que le canal cochléaire qui intervient dans l'audition.

### 1.4.1 Système vestibulaire

Les organes vestibulaires servent à détecter la position et les mouvements de la tête dans l'espace. Dans le labyrinthe vestibulaire, les cellules ciliées se développent en deux sous-types selon leur morphologie : le type I est globulaire ou en forme de flacon et est entouré au niveau de ses faces latérales et de sa face basale par un calice nerveux afférent formé d'une épaisse fibre nerveuse, tandis que le type II est cylindrique et innervé par de multiples terminaisons nerveuses de petit calibre faiblement granulaires (Wersall, 1956; Gopen et al., 2003 ; Desai et al., 2005a, b). Les différences fonctionnelles entre les deux types ne sont pas bien comprises.

Les macules sont des épithéliums pseudostratifiés recouverts d'une substance gélatineuse appelée membrane des otoconies (ou otolithes), car elle contient de petits cristaux de carbonate de calcium, les otoconies. Les cils des cellules ciliées (stéréocils et kinocils) sont entourés par la membrane otolithique, mais sont séparés de la matrice par un espace endolymphatique étroit (Fig. 7A). La macule utriculaire est localisée dans le mur antérieur de l'utricule en position horizontale lorsque l'animal dresse naturellement la tête, alors que la macule sacculaire est localisée ventrolatéralement dans le mur du saccule en position verticale. Chaque crête ampullaire, quant à elle, est localisée dans un élargissement d'un canal semi-circulaire, proche de l'utricule, appelé ampoule. Elles sont disposées orthogonalement l'une par rapport à l'autre, les crêtes antérieure et postérieure dans un plan vertical, alors que l'ampoule latérale est inclinée d'environ 30°. Chaque crête prend la forme d'un bourrelet recouvert de l'épithélium sensoriel formé par des cellules de soutien et des cellules ciliées caractérisées par des cils beaucoup plus longs que ceux des cellules ciliées maculaires. Les crêtes sont recouvertes d'une substance gélatineuse, la cupule, qui atteint le sommet du toit de l'ampoule (Fig. 7C) (Burns et Stone, 2017; Kahle et Frotscher, 2002).



**Figure 7. Organes sensoriels vestibulaires chez un mammifère adulte.** (A-B) Représentation schématique d'une macule au repos (A) et après une inclinaison de la tête (B). À ce niveau, le déplacement de la membrane otolithique provoque une inclinaison des stéréocils vers le kinocil, mais à d'autres niveaux, l'inclinaison peut être différente. (C-D) Une ampoule au repos (C) et à la suite de la rotation de la tête (D). L'endolymphe exerce alors une pression contre la cupule qui entraîne un mouvement des cils.

Les cellules ciliées doivent leur nom à la présence d'au moins 50 longues microvillosités appelées stéréocils en plus de posséder un kinocil unique, qui est structurellement plus proche d'un flagelle que d'une microvillosité. Ces cils interconnectés portent le nom de faisceau ou boucle de stéréocils. 50 à 100 stéréocils, disposés en 10 à 15 rangées de hauteur croissante, donnent au faisceau une apparence en escalier. La composition en protéines des faisceaux de cils vestibulaires a été beaucoup étudiée au niveau de l'utricule de poussin (Shin et al., 2013), de souris (Dumont et al., 2002; Krey et al., 2015; Shin et al., 2007, 2010) et de rat (Krey et al., 2016; Wilmarth et al. 2015), démontrant l'abondance de l'actine qui représente plus de 50% des protéines totales dans chaque cil (Krey et Barr-Gillespie, 2018). Les stéréocils ont un diamètre relativement uniforme sur la majeure partie de leur longueur, mais sont étroits au niveau de leur insertion apicale dans le soma de la cellule ciliée. Cette « cheville » permet aux stéréocils de se mouvoir librement lorsqu'ils sont déviés. Contrairement aux stéréocils cochléaires, ceux des organes vestibulaires maintiennent des liens moléculaires au niveau du kinocilium et de la cheville, en plus des liaisons de pointe à l'âge adulte. La persistance de ces liens assure la cohésion du faisceau qui se déplace comme une unité lorsqu'il est stimulé en un seul point (Tsuprun et Santi, 2002; Tsuprun et al., 2003). La nature de la stimulation de ces faisceaux varie en fonction de leur emplacement (Dallos et al., 2008; Furness et Hackney, 2006). Par exemple, lorsque la tête se déplace par rapport à la gravité, le poids des otolithes permet à la membrane otolithique qui recouvre les macules de bouger légèrement dans la direction du vecteur gravitaire. Ce mouvement déplace les cils des cellules ciliées et entraîne conséquemment leur excitation ou leur inhibition selon que le mouvement s'effectue en direction du kinocil ou pas. Les organes maculaires servent donc à percevoir l'accélération linéaire reliée à la gravité (Fig. 7B). Les ampoules, elles, captent l'accélération angulaire induite par les mouvements de rotation de la tête selon les trois axes des canaux semi-circulaires (sagittal, transverse et vertical). Ces mouvements font en sorte que l'endolymphe contenue dans les canaux

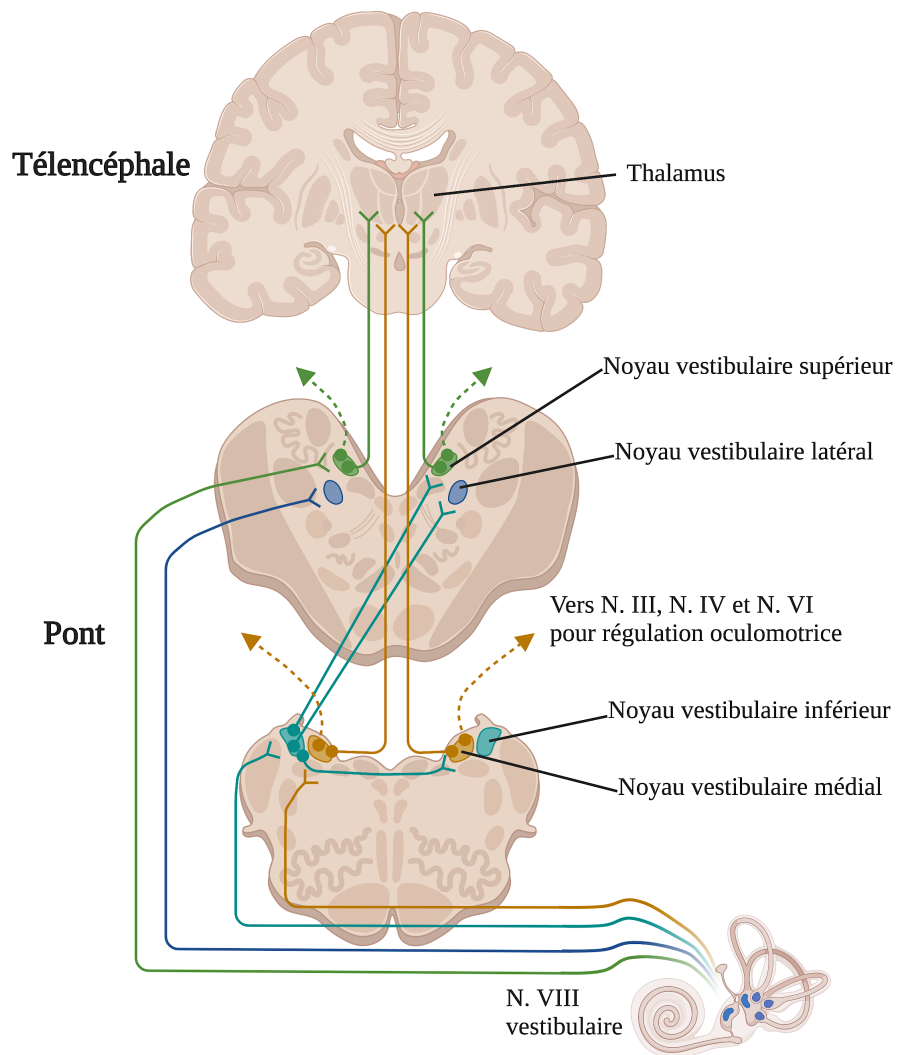
déplace les cupules, entraînant également un déplacement des cils et une modification de l'activité des cellules ciliées (Fig. 7D). Les cellules ciliées de tous les organes vestibulaires sont innervées par les prolongements périphériques des neurones sensoriels dont les corps cellulaires se trouvent dans le ganglion vestibulaire, aussi appelé ganglion de Scarpa. Les prolongements centraux forment le nerf vestibulaire qui s'accôle, sans se mélanger, au nerf cochléaire pour former le huitième nerf crânien, le nerf vestibulocochléaire ou statoacoustique (8N ou VIII). La partie supérieure du nerf vestibulaire innerve les canaux horizontal et antérieur en plus de l'utricule, tandis que la partie inférieure innerve le canal postérieur et le saccule (McKinley et al., 2014 ch. 16). Ces prolongements axonaux font synapses avec les cellules nerveuses vestibulaires et avec certaines régions du cervelet (Barmack, 2003; Angelaki et Cullen, 2008).

Les afférences primaires transmettent directement les signaux des organes vestibulaires vers le complexe vestibulaire qui comprend quatre noyaux principaux, soit du plus rostral au plus caudal: les noyaux vestibulaires supérieur (SuVe), médial (MVe), latéral (LVe) et inférieur (ou spinal) (SpVe). Ces noyaux sont le siège du premier traitement des informations vestibulaires. Chaque noyau reçoit une différente combinaison d'informations sensorielles, dont les signaux proprioceptifs des muscles du cou (Gdowski et McCrea, 2000) et des signaux oculomoteurs (Cazin et al., 1982). De plus, certaines régions corticales émettent également des projections vers les noyaux vestibulaires comme le cortex vestibulaire pariéto-insulaire et le cortex somatosensoriel primaire (Ventre et Faugier-Grimaud, 1988). Une convergence de l'information des trois systèmes sensoriels impliqués dans le contrôle de l'équilibre a donc lieu au sein des noyaux vestibulaires. Finalement, certains neurones commissuraux assurent la connexion des noyaux controlatéraux afin de permettre le traitement des informations provenant des deux oreilles internes (Uchino et al., 2001).



À la suite de l'intégration des informations qu'ils reçoivent, les noyaux vestibulaires relaient des signaux à différentes structures nerveuses. Le noyau inférieur intègre principalement des signaux provenant des organes otolithiques et ses projections axonales efférentes font synapse avec les noyaux vestibulaires controlatéraux, le cervelet et les neurones de la moelle épinière. Ces derniers sont dirigés vers des cibles motrices en empruntant les faisceaux vestibulo-spinaux en vue de maintenir le tonus musculaire et l'équilibre (Pompeiano, 1972). Les noyaux supérieur et médian, quant à eux, intègrent principalement des informations provenant des canaux semi-circulaires pour ensuite projeter vers le thalamus. Ils empruntent aussi la voie vestibulo-spinale médiale qui innerve autant les motoneurones cervicaux que des motoneurones contrôlant l'activité des muscles oculaires. De plus, les projections axonales des noyaux SuVe et MVe sont également dirigées vers les motoneurones oculomoteurs. Ces projections régissent les mouvements réflexes des yeux (mouvement oculomoteur) et de la tête en transmettant des influx nerveux aux noyaux des nerfs crâniens oculomoteur (III), trochléaire (IV) et abducens (VI). Finalement, le noyau vestibulaire latéral intègre des signaux des organes otolithiques, des canaux semi-circulaires et du cervelet (Fig. 8). Les neurones qui le composent sont à l'origine de la voie vestibulo-spinale latérale qui fait synapse sur les motoneurones de la corne ventrale ipsilatérale ; cette voie est impliquée dans le contrôle des réponses posturales en fonction de la perturbation de la tête (Feldman et Orlovsky, 1972). D'autre part, tous les noyaux vestibulaires et le noyau fastigial du cervelet possèdent des neurones qui projettent vers la formation réticulée et peuvent ainsi exercer un contrôle indirect des motoneurones de la moelle épinière par la voie réticulo-spinale (Peterson et Abzug, 1975 ; Peterson et al., 1975). Celle-ci possède d'ailleurs un haut degré de collatéralisation axonale avec les deux voies réticulo-spinales décrites, latérales et médiales, et innerve la moelle épinière jusqu'aux segments lombaires (Kasumacic et al., 2015; Lambert et al., 2016). Grâce à cette organisation, les noyaux vestibulaires traitent les informations perçues par les organes vestibulaires et transfèrent

ces signaux à d'autres centres nerveux pour leur traitement supérieur permettant la conscience de la position du corps et vers des voies descendantes contrôlant l'activité musculaire comme la stabilisation de la tête dans l'espace.

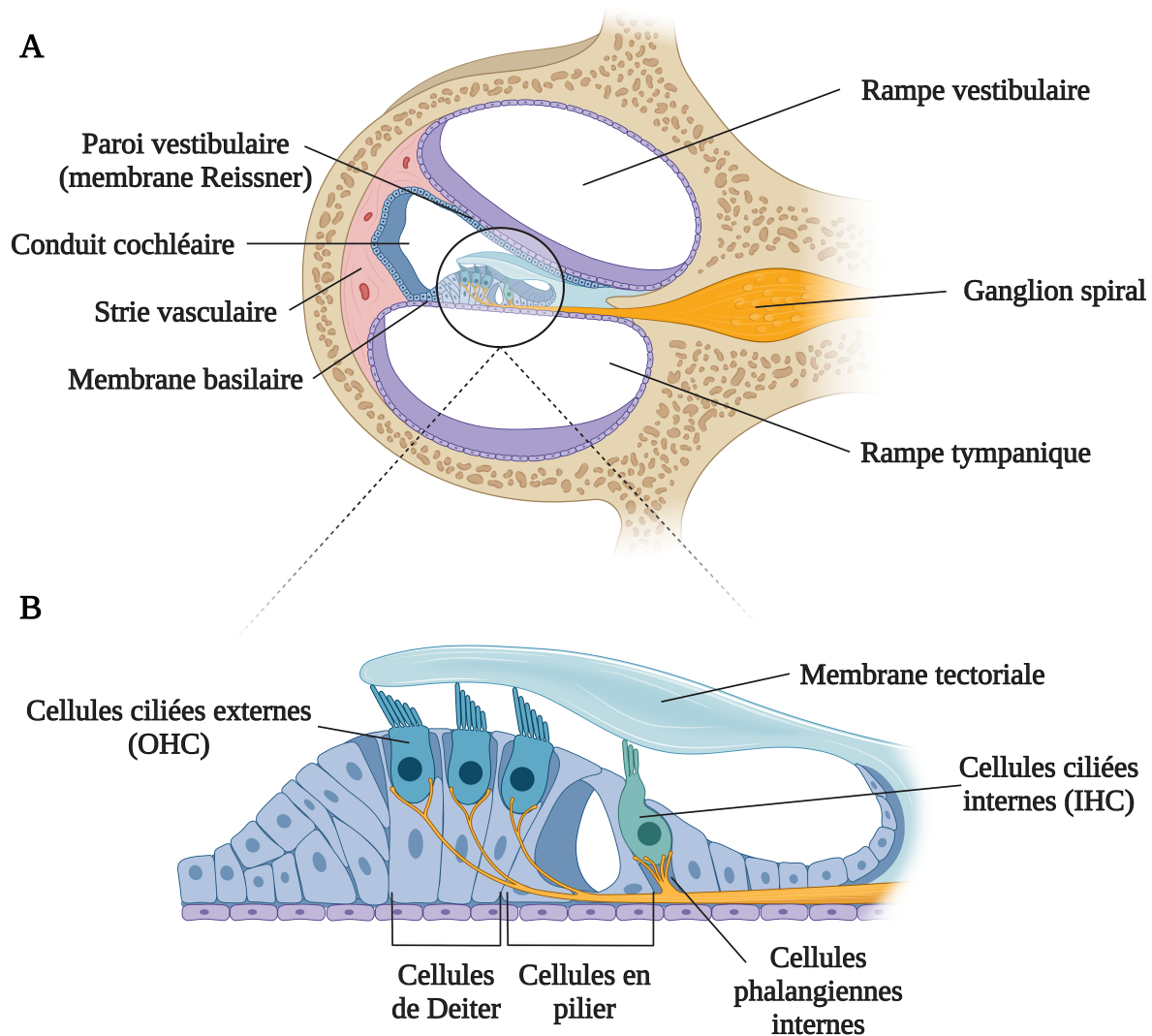


**Figure 8. Noyaux vestibulaires chez l'humain.** Le schéma situe approximativement la localisation du noyau vestibulaire médial en ocre, du noyau vestibulaire inférieur en turquoise, du noyau vestibulaire latéral en bleu et du noyau vestibulaire supérieur en vert dans le tronc cérébral ainsi que leurs projections vers le thalamus.

### 1.4.2 Système cochléaire

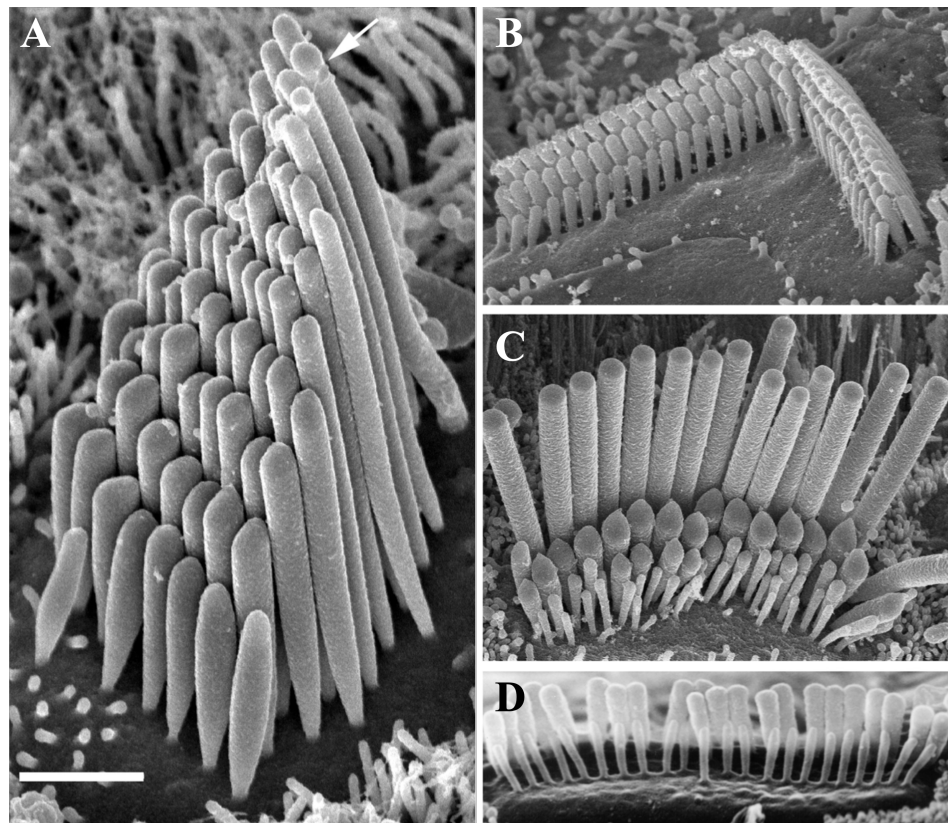
Chez les mammifères, la cochlée s'enroule autour d'un axe osseux conique, le modiolus, qui contient les corps cellulaires du ganglion spiral, les faisceaux nerveux qui en sont issus et le nerf cochléaire. Le long de l'axe, on retrouve le conduit cochléaire au-dessus duquel se trouve la rampe vestibulaire et en dessous duquel se situe la rampe tympanique. Le conduit ou canal cochléaire est rempli d'endolymphe et d'une portion du labyrinthe membraneux qui se prolonge dans la cochlée. Il a grossièrement la forme d'un triangle avec une paroi externe élargie, appelée strie vasculaire, qui est composée d'une muqueuse vascularisée qui sécrète l'endolymphe. Le toit et le plancher du conduit cochléaire sont formés respectivement de la paroi vestibulaire (dite membrane de Reissner) et de la membrane basilaire, laquelle supporte l'organe sensoriel de l'audition : l'organe de Corti (ou organe spiral) (Fig. 9A). On retrouve dans cet épithélium spécialisé une rangée de cellules ciliées interne (IHC), plusieurs rangées de cellules ciliées externes (OHC) et plusieurs sous-types de cellules de soutien. Ces dernières comprennent les cellules phalangiennes internes sur lesquelles sont placées les IHC, les cellules de pilier interne et externe qui entourent le tunnel de Corti, ainsi que les cellules phalangiennes externes (dites de Deiters) qui supportent les OHC (Fig. 9B). Les cellules ciliées des vertébrés, comme celles des organes de la ligne latérale des poissons, de tous les amphibiens larvaires et des amphibiens aquatiques matures, sont des cellules épithéliales polarisées qui réagissent à des mouvements de liquides – qu'ils soient induits par des sons ou des mouvements d'eau autour du corps – en générant des signaux électriques qui sont ensuite relayés via des neurones sensoriels au système nerveux central. Chez les mammifères, les cellules ciliées externes et internes jouent des rôles différents dans l'audition. En effet, les OHC sont électromotiles, ce qui leur permet de réagir à la dépolarisation en se contractant en phase avec les mouvements de la membrane basilaire, ce qui tend à rapprocher la membrane tectoriale, une

structure gélatineuse acellulaire qui surplombe l'organe de Corti, et ainsi à amplifier la stimulation en plus d'améliorer la sensibilité au son. Les IHC, elles, transfèrent les signaux électriques aux noyaux cochléaires via un appareil présynaptique élaboré, relayant ainsi les informations au centre auditif supérieur qui conduit à la perception auditive (Ashmore, 2008; Meyer et Moser, 2010). La détection des stimuli est possible grâce aux stéréocils, soit une structure hautement spécialisée située au pôle apical de la cellule ciliée. Les plus longs stéréocils des OHC se prolongent jusque dans la membrane tectoriale, alors que ceux des IHC ne sont pas attachés directement à la membrane, mais se trouvent dans l'espace sous-tectorial étroit rempli d'endolymphe (Iizuka-Kogo, 2018; Kahle et Frotscher, 2002).



**Figure 9. Schéma du système cochléaire chez un mammifère adulte. (A)** Le canal cochléaire et ses trois conduits remplis de liquide, soit le conduit cochléaire, la rampe tympanique et la rampe vestibulaire. **(B)** L'organe de Corti. Localisation des cellules ciliées internes (vert), des cellules ciliées externes (bleu) et de différentes cellules de soutien.

Les stéréocils sont des organites qui font saillie à la surface apicale de cellules épithéliales et qui se présentent sous une variété de formes et de tailles dans différents organes et espèces et sont vraisemblablement adaptés aux paramètres de stimulation que chacun rencontre (Tilney et al., 1992). Dans les cellules ciliées, de nombreux cils s'agencent en faisceaux ou boucles dont la structure peut varier. Par exemple dans la cochlée de rongeur, les stéréocils des OHC sont agencés en plusieurs rangées selon une formation triangulaire où l'on note une augmentation de la hauteur des cils vers une pointe du triangle (Fig. 10B), tandis que les rangées de IHC ont une formation plus linéaire (Fig. 10C) (Barr-Gillespie, 2015; Beurg et al., 2006; Tadenev et al., 2019). Néanmoins, tous se conforment, au moins pendant les premiers stades de leur développement, au même plan de base, contenant deux rangées ou plus de stéréocils disposés en escalier, avec des rangées successives de hauteur croissante (Fig. 10) (Furness et Hackney, 2006; Manley, 2000). Dépendamment de l'organe dans lequel ils se trouvent, les stéréocils matures peuvent regrouper jusqu'à 5 types de liaisons : liaison de kinocil, liaison de pointe, liaison supérieure, liaison latérale et liaison de cheville. L'inclinaison oblique de la liaison de pointe est la seule ayant été reconnue comme parfaitement adaptée pour l'activation d'un canal ionique mécanosensible (Cotanche et Corwin, 1991; Pickles et al. 1984; Pickles et Corey, 1992; Richardson et Petit, 2019). Chaque stéréocil possède un centre de filament d'actine étayé par des protéines, dont la plastine-1, la fascine-2 (Shin et al., 2010) et l'épine (Zheng, 2000). Ces composantes sont moins nombreuses dans la région basale des stéréocils, ce qui se traduit en une flexibilité accrue (Flock et Cheung, 1977; Tilney et Tilney, 1986). Les filaments d'actines qui s'y trouvent sont plus densément agglomérés et interconnectés grâce à la protéine de liaison de l'actine : TRIOBP, ce qui augmente probablement la résistance de cette région (Kitajiri et al., 2010). Avec l'application d'une force, les stéréocils se plient, se tordent et dévient, ce qui permet de transmettre cette force mécanique aux canaux mécanosensibles environnants qui assurent la transduction auditive.



**Figure 10. Visualisation par microscopie électronique à balayage des stéréocils chez différentes espèces. (A)** Cellule ciliée auditive immature de tortue présentant neuf rangées de stéréocils et un kinocil (flèche) (Hackney et al., 1993). **(B)** OHC de rat avec trois rangées de stéréocils en formation triangulaire. **(C)** IHC de rat avec trois rangées de stéréocils en escalier de forme plus linéaire. **(D)** IHC de chauve-souris avec deux rangées de stéréocils dans la région apicale du canal cochléaire (Vater et Lenoir, 1992). Barres d'échelle, 1  $\mu\text{m}$  en A et 2  $\mu\text{m}$  de B-D. (Adapté de Fettiplace et Kim, 2014).

Pour ce faire, les ondes sonores sont recueillies par le pavillon de l'oreille externe, pénètrent dans le méat auditif et font vibrer la membrane tympanique. Les vibrations sont transmises à l'oreille interne par la chaîne des osselets de l'oreille moyenne - le marteau, l'enclume et l'étrier – et se traduisent en ondes de pression dans la périlymphe des rampes vestibulaire et tympanique, faisant osciller la membrane basilaire. L'amplitude des oscillations de la membrane varie selon la position baso-apicale de la membrane en fonction de la fréquence de stimulation. Ainsi, les fréquences plus lentes, induites par les sons graves, vont stimuler de manière maximale les régions apicales alors que les fréquences plus rapides, induites par les sons aigus, vont stimuler les régions basales. À la position maximale de stimulation, les mouvements de la membrane basilaire entraînent une torsion des stéréocils qui mène à l'ouverture de canaux ioniques et à une dépolarisation des cellules ciliées. Les IHC sont innervées par les prolongements périphériques de 10-20 cellules ganglionnaires, et réagissent à la dépolarisation en relâchant des neurotransmetteurs excitateurs qui déclenchent un signal nerveux dans ces prolongements. Les corps des cellules ganglionnaires forment le ganglion spiral, qui s'enroule autour du modiolus, et leurs prolongements centraux forment le nerf cochléaire qui s'amorce au centre de la cochlée et se termine majoritairement dans les noyaux cochléaires centraux au niveau du bulbe rachidien (Simon et al., 2009). Une organisation tonotopique des fibres est maintenue à l'intérieur du nerf le long de la voie auditive ; les fibres innervant les extrémités apicales de la cochlée se distribuent plutôt postéro-latéralement dans le nerf et se terminent ventralement dans les noyaux cochléaires, tandis que les fibres innervant l'extrémité basale de la cochlée se distribuent plutôt médialement dans le nerf et se terminent dorsalement dans les noyaux cochléaires (Geisler, 1998 ; De Ridder et al., 2004).

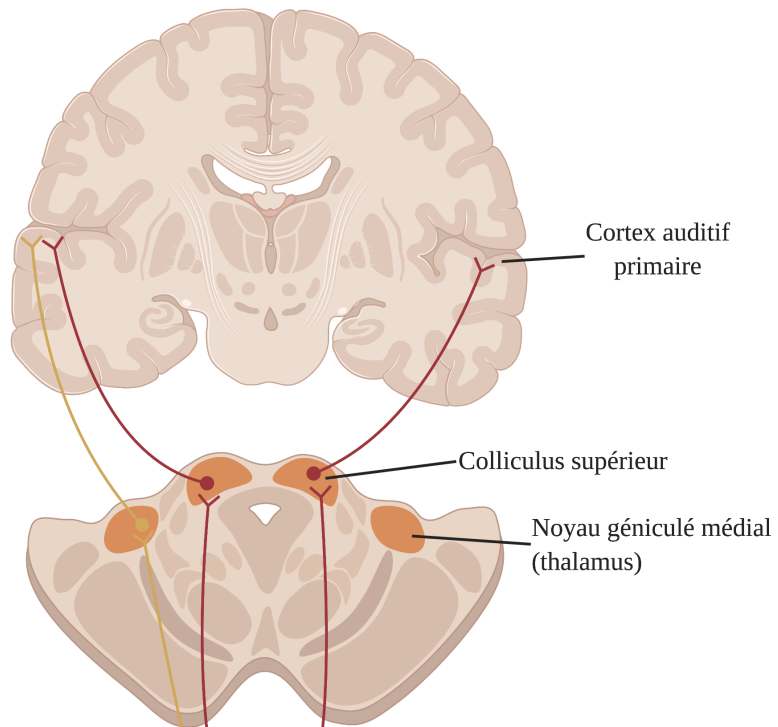
Les neurones des noyaux cochléaires sont à l'origine de plusieurs systèmes de projection dans le SNC, mais les décrire en détail dépasserait le cadre du présent travail. Nous ne décrivons ici que



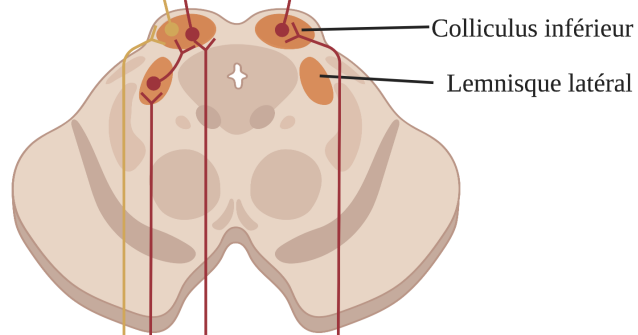
les deux plus importants : les projections vers le corps trapézoïde et l'olive supérieure et les projections vers le colliculus inférieur. Les projections vers le noyau du corps trapézoïde et les subdivisions de l'olive supérieure concernent majoritairement le noyau cochléaire ventral. Ces projections sont bilatérales, et leur rôle principal est de permettre une comparaison des inputs provenant des deux oreilles (analyse binaurale) afin de déterminer l'origine spatiale du son (Simon et al., 2009). Ces projections ont aussi pour objectif de moduler l'activité électromotile des OHC en plus de participer aux réflexes acoustiques qui limitent les mouvements de la chaîne des osselets lorsque les sons sont forts. Les deux noyaux cochléaires, ventral et dorsal, sont aussi à l'origine de projections essentiellement controlatérales formant le lemnisque latéral, qui se termine principalement dans le colliculus inférieur. En plus des efférences cochléaires, ce faisceau contient des fibres provenant de l'olive supérieure et du noyau du lemnisque latéral.

Les neurones du colliculus inférieur relaient l'information acoustique vers le corps géniculé médial au travers du bras conjonctival inférieur, et les projections efférentes géniculaires forment les radiations auditives qui se terminent dans le cortex auditif primaire, situé dans le lobe temporal (Fig. 11) (Venkataraman et Bartlett, 2013). Le rôle de ce système de projection est de permettre la perception et la reconnaissance des sons (Cohen et Knudsen, 1999 ; Kahle et Frotscher, 2002 ; McKinley et al., 2014 ch.16).

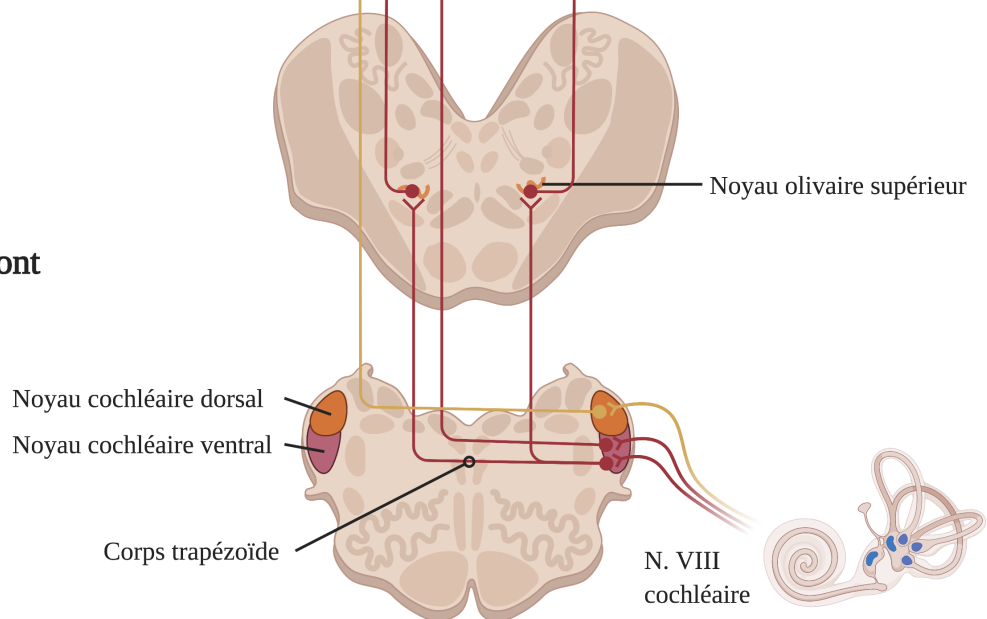
## Téleencéphale



## Mésencéphale



## Pont



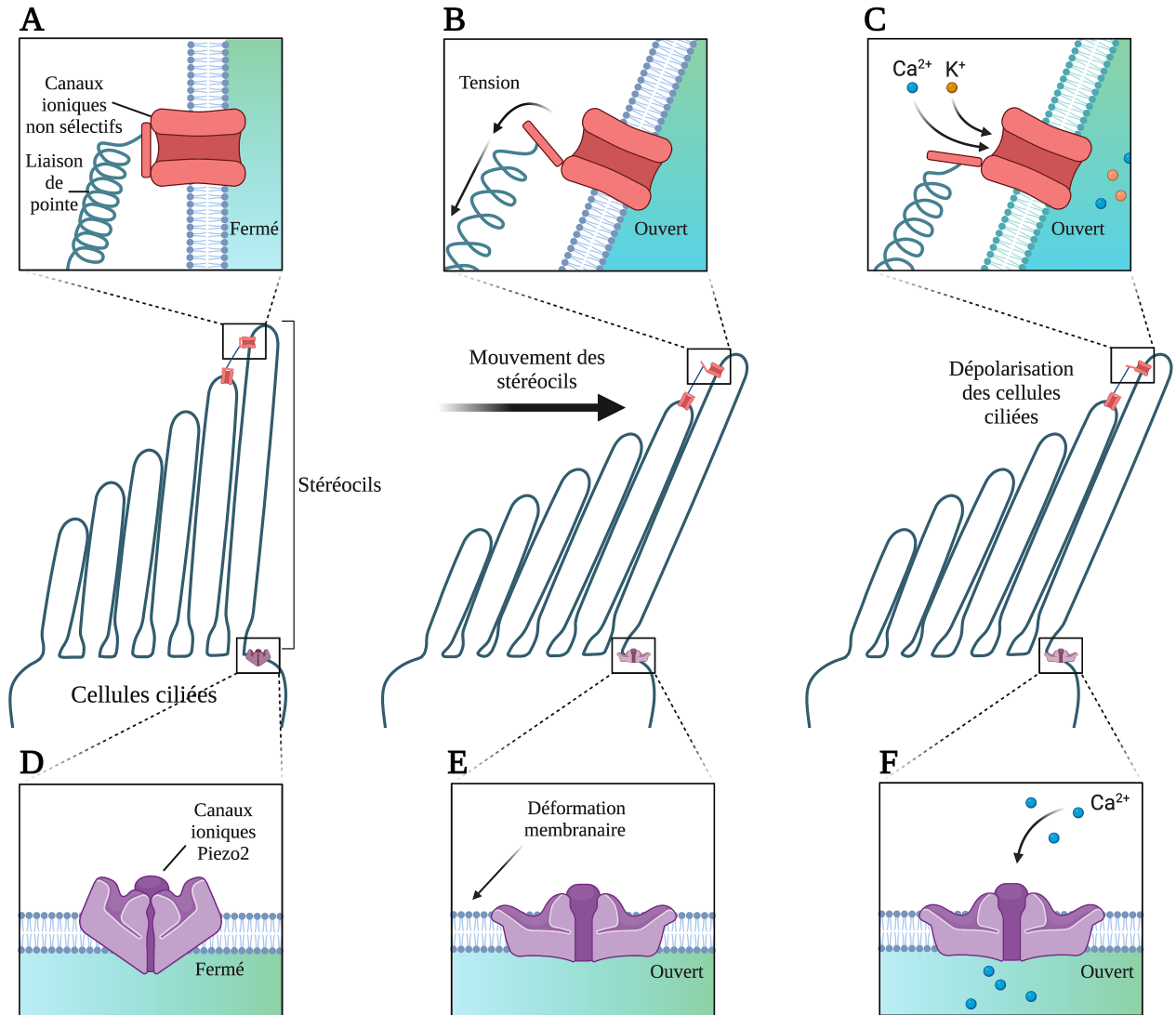
**Figure 11. Principales voies auditives centrales chez l'humain.** Le schéma situe approximativement la localisation des deux noyaux cochléaires au niveau du tronc cérébral ainsi que leurs projections vers le corps trapézoïde et l'olive supérieure, en plus des projections vers le colliculus inférieur.

### 1.4.3 Récepteurs des cellules ciliées auditives

Récemment, diverses études ont porté sur les canaux ioniques utilisés pour la perception mécanique par les cellules ciliées auditives. Le modèle largement accepté de transduction des cellules ciliées soutient que la déflexion en direction du plus long cil module la tension dans les liaisons de pointe, soit les filaments connectant l'extrémité d'un cil à la paroi latérale de son voisin (Fig. 12A), provoque l'ouverture de canaux de transduction non sélectifs situés au sommet des stéréocils (Furness et Hackney, 1985; Hackney et Furness, 1995; Furness et al., 1997; Gillespie et Müller, 2009). Une augmentation de la tension dans les liaisons de pointe ouvre les canaux avec lesquels ils sont connectés (Fig. 12B) permettant au calcium d'entrer et de se lier aux sites intracellulaires qui favorisent la libération de neurotransmetteur (Fig. 12C) (Hudspeth, 1982 ; Jaramillo et Hudspeth, 1991). Les courants induits par ce type de mécanotransduction sont dits « normaux » (Hudspeth, 1982; Denk et al., 1995). Les premières liaisons de pointes matures et leur courant de transduction normal commencent à être enregistrés chez la souris à partir de P7 (Webb et al., 2011). Différentes protéines transmembranaires répondant à ces critères « normaux » ont été proposées comme canaux de mécanotransduction potentiels. Celles-ci incluent des protéines membranaires ne formant pas de canaux, comme les protéines transmembranaires Tetraspan des stéréocils (TMHS/LHFPL5), et des canaux transmembranaires (TMC). Ces dernières sont probablement plus cruciales, car il a été montré que les gènes 1 et 2 (TMC1 et TMC2) sont nécessaires pour permettre une mécanosensibilité des cellules ciliées cochléaires (Kawashima et al., 2011; Kim et al., 2013;

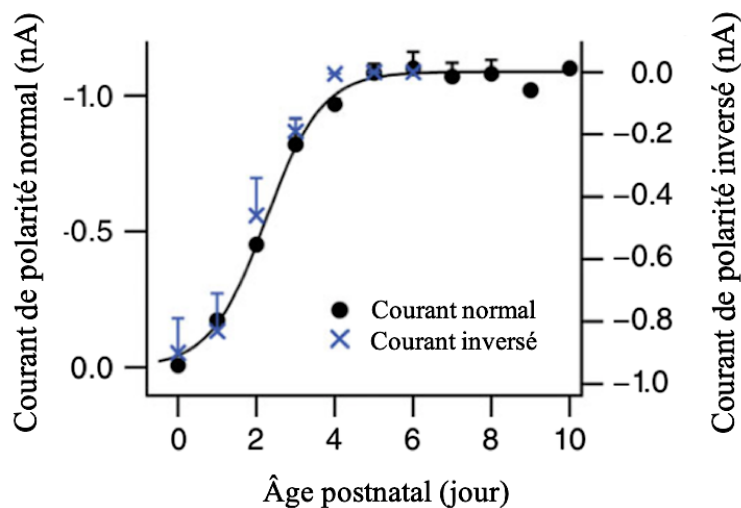
Kurima et al., 2012; Maeda et al., 2014; Pan et al., 2018; Vreugde et al., 2002). Plus spécifiquement, les TMC1/2 contribuent aux propriétés de perméation moléculaire, assurant la séparation des cations selon leur taille et ainsi l'entrée de calcium dans la cellule (Pan et al., 2013). Les sous-unités CIB2 et CIB3 se lient à TMC1/2 afin de réguler leur fonction au niveau des stéréocils (Liang et al., 2021). Les protéines transmembranaires de l'oreille interne (TMIE), requises pour le ciblage des TMC, sont également essentielles pour la transduction (Pacentine et Nicolson, 2019; Qiu et Müller, 2018, Zhao et al., 2014). Malgré tout, ces canaux n'expliquent pas à eux seuls l'étendue de l'expression mécanoréceptrice des cellules ciliées. Car dans les expériences avec des doubles mutants TMC1 et TMC2, ou après la destruction des liaisons de pointe, le courant de mécanotransduction normal est perdu, pour être remplacé par un courant mécaniquement sensible évoqué par des stimuli de polarité inverse (Alagramam et al., 2011; Marcotti et al., 2014).

Ce type de courant de polarité inverse serait généré, entre autres, par le canal ionique mécanosensible Piezo2 (Beurg et Fettiplace, 2017). Le courant est activé par la déflexion des cils dans la direction opposée vers le stéréocil le plus court. Ce déplacement entraînerait des déformations membranaires résultant en l'ouverture des canaux Piezo2 situés à la base des cils, sur la surface apicale des cellules (Fig. 12D-F). Cela a été démontré à la naissance chez la souris, où Piezo2 est très faiblement, voire aucunement exprimé au sommet des stéréocils, alors qu'une expression est décelable à la surface apicale des cellules ciliées au niveau des OHC dès E16.5 (Johnson et al., 2005; Wu et al., 2017). Il semble donc, du moins chez la souris naissante, que des canaux ioniques mécanosensibles se trouvant sur les stéréocils ont une action physiologique moins importante que ceux insérés dans la membrane apicale à la base des cils (Fig. 12D). Mais cela change avec l'âge.



**Figure 12. Localisation des canaux de transductions ioniques sur les cellules ciliées auditives de la souris.** (A-C) Modèle de transduction original qui soutient que la déflexion des cils module la tension dans les liaisons de pointe situées au sommet des stéréocils (A) et provoque l'ouverture des canaux de transduction non sélectifs (B) ce qui permet le passage des ions (C). (D-F) Modèle de transduction proposé pour les canaux Piezo2 situés à la surface apicale des cellules ciliées (D). La déformation de la membrane basale induit le déplacement des lames périphériques (E) et l'ouverture du pore central conducteur d'ion (F).

À des stades immatures de développement chez les rongeurs, les courants évoqués mécaniquement dans les cellules ciliées sont moins sensibles au sens de la direction de la déflexion des cils que dans les cellules ciliées matures, révélant des courants de polarité normale et inversée simultanément. Avec le développement des cellules ciliées cochléaires, les courants normaux et inversés suivent des courbes d'activation parallèle, mais de sens opposé : l'intensité des courants inversés est maximale à la naissance puis décroît lentement. Inversement, les courants normaux sont nuls à la naissance et deviennent rapidement d'intensité maximale (Fig. 13) (Beurg et al., 2016; Kim et al., 2013). Le rôle fonctionnel que peuvent avoir ces courants de polarité inverse dans la transduction auditive précoce n'a pas encore été déterminé.

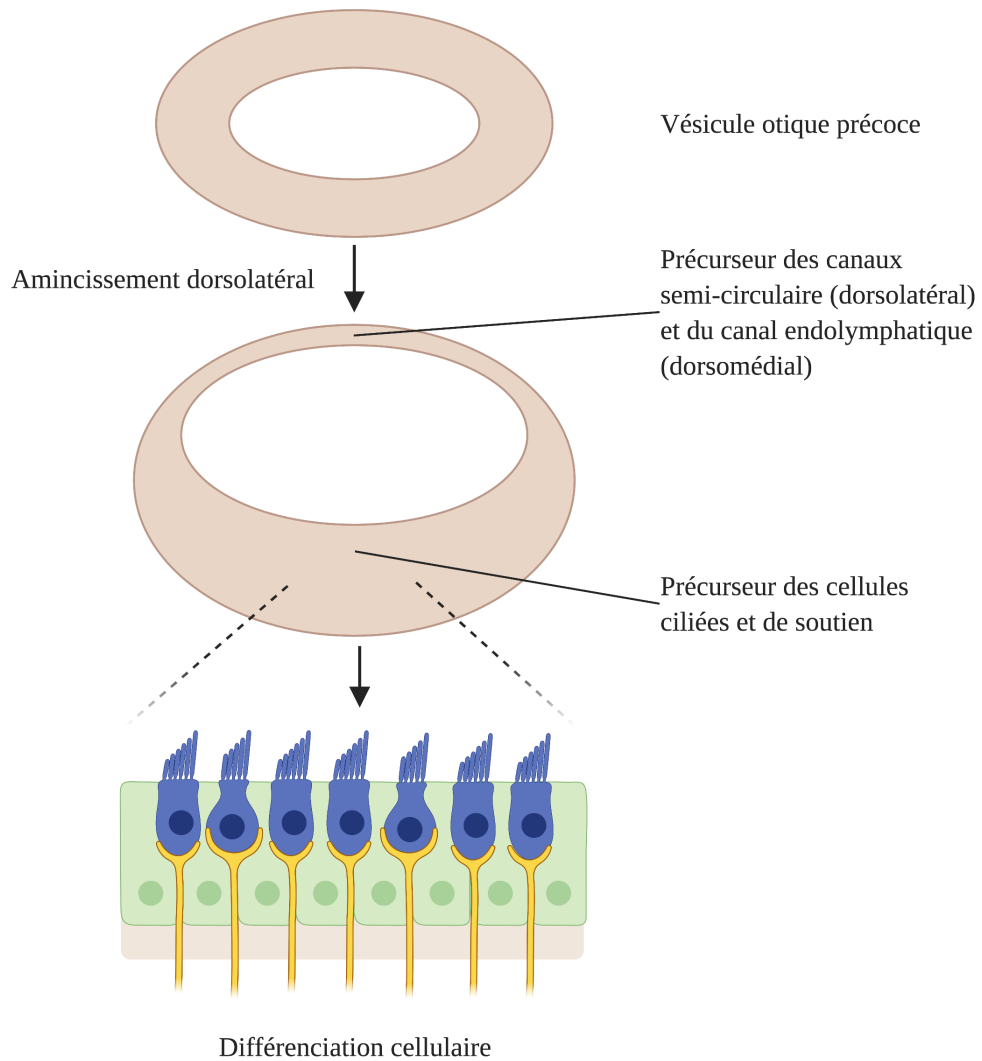


**Figure 13. Courant de polarité normale et inversé des cellules ciliées externes cochléaires chez la souris postnatale.** Les enregistrements sont réalisés en patch clamp et les courants entrants sont d'autant plus intenses qu'ils sont négatifs. Les courants de polarité normale sont induits par des déflexions des cils en direction des plus longs, alors que les courants de polarité inversée sont évoqués par des déplacements vers les plus courts. Lors des 4 premiers jours postnataux, on observe une diminution de l'intensité du courant de polarité inversée parallèle à une augmentation du courant de polarité normale. (Adapté de Beurg et Fettiplace, 2017).

## 1.4.4 Développement de l'oreille interne

### 1.4.4.1 Développement de la vésicule otique

Autant le système vestibulaire que cochléaire de l'oreille interne prend origine des placodes otiques (Groves, 2005; Bryant et al., 2002), c'est-à-dire de régions de l'ectoderme embryonnaire situées de part et d'autre du rhombencéphale antérieur qui s'épaississent avant de s'invaginer dans le mésoderme pour former une structure sphérique, avec une paroi épithéliale simple et remplie de liquide, appelée vésicule otique ou otocyste (Alsina et Whitfield, 2017). La formation de la vésicule otique survient à des jours embryonnaires variables selon les espèces. Par exemple, celle-ci se forme vers E9.5 chez la souris *Mus musculus* (Morsli et al., 1998) et vers E10.5 chez l'opossum *Monodelphis domestica* (Ashwell et Shulruf, 2014; Smith, 2001). Une fois formée, la vésicule commence à subir une série de modifications morphologiques débutant par un épaississement de sa paroi ventralement par une prolifération cellulaire qui donnera naissance aux différentes cellules – sensorielles et de soutien – des organes sensoriels de l'oreille. La région dorsale de l'épithélium vésiculaire, où la prolifération cellulaire n'est pas aussi forte que ventralement, demeure relativement mince et formera les dérivés non sensoriels, dont les canaux semi-circulaires et le canal endolymphatique (Fig. 14) (Alsina et Whitfield, 2017).



**Figure 14. Développement de la vésicule otique.** Le schéma illustre les premières étapes de la transformation de la vésicule otique et indique la localisation de l'épithélium qui donnera naissance aux régions sensorielles. Après son internalisation, la vésicule devient asymétrique selon l'axe dorso-ventral, par prolifération et migration cellulaires dans la portion ventrale de l'épithélium. Les cellules de la portion ventrale se différencient en cellules ciliées (bleu), en cellules de soutien (vert) et en cellules de l'épithélium membraneux (beige). Inspiré de Alsina et Whitfield, 2017.



### 1.4.4.2 Développement du labyrinthe vestibulaire

Chez les euthériens, le développement des organes sensoriels vestibulaires est bien documenté. Il débute par la sortie du cycle mitotique à partir de E13.5-14.5 dans les épithéliums sensoriels vestibulaires chez les souris et les rats (Ruben, 1967; Sans et Chat, 1982; Slowik et Bermingham-McDonogh, 2016), ce qui correspond au début de la différenciation des cellules ciliées. Les premiers cils sont visibles à E13.5, mais seulement au niveau des macules (Denman-Johnson et Forge, 1999; Mbiene et al., 1984), alors qu'ils apparaissent dans les crêtes ampullaires à E15 chez la souris (Mbiene et Sans, 1986). Peu après leur apparition, les cils recouvrent la majorité de la surface apicale des cellules ciliées avec un kinocil central entouré de stéréocils. Au départ, les cils sont de longueur équivalente, mais entre E16 et E18, le kinocil s'allonge pour atteindre sa morphologie plus mature. À E17, des liaisons de pointe sont visibles entre la paroi latérale des cils des cellules ciliées utriculaires et des courants de transduction mécaniques robustes sont enregistrés (Geleoc et Holt, 2003). Ces résultats suggèrent une activité mécanotransductrice potentielle à ce stade. À E18, le contact synaptique des cellules ciliées avec leurs fibres afférentes est établi, permettant un relais de l'information aux noyaux vestibulaires et au lobe flocculo-nodulaire du cervelet.

Pendant ce temps, la membrane des otoconies, qui recouvre les cils, débute sa maturation simultanément sur toute la longueur des macules vers E16.5 et des otoconies sont visibles à partir de E18 chez la souris (Denman-Johnson et Forge, 1999) et entre E16-E18 chez le rat (Anniko, 1980). Chez d'autres espèces de mammifères, cette membrane pourrait se développer plus précocement. En effet, une membrane otolithique a été décrite chez différentes espèces de marsupiaux d'opossums *Didelphis virginia* (Krause, 1991) et *Monodelphis domestica* (Pflieger et Cabana, 1996), wallaby *Macropus eugenii* (McCluskey et al., 2008) et chat marsupial *Dasyurus*

*hallucatus* (Gemmell et Nelson, 1992) à la naissance, correspondant en moyenne à un stade E13 chez la souris (Clancy et al., 2007).

Au niveau central, la différenciation des noyaux du complexe vestibulaire se produit entre E11 et E18 chez le rat (Maklad et Fritsch, 2003). La maturation du cervelet débute à E13 et s'étend jusqu'à la 2<sup>e</sup> semaine de vie postnatale où de nombreuses afférences vestibulaires sont décelées (Kakizawa et al., 2000). L'apparition des potentiels vestibulaires évoqués en réponse à des accélérations linéaires débute entre P7 et P8 chez le rat (Curthoys, 1979, 1982; Freeman et al., 1999) et la souris (Desmadryl et al., 1986). Ces données montrent que les structures vestibulaires sont morphologiquement bien développées à la naissance chez les mammifères placentaires. Néanmoins, elles poursuivent leur maturation jusqu'à environ 1 mois après la naissance. Ainsi, les étapes importantes du développement des cellules sensorielles vestibulaires et leurs structures associées ont largement lieu *in utero* chez les euthériens. Cependant, des données à des âges comparables sont peu disponibles chez les marsupiaux.

Chez de nombreuses espèces de marsupiaux, les nouveau-nés présentent un géotropisme négatif, c'est-à-dire qu'ils orientent leur tête et rampent contre la gravité vers le haut. Ce comportement, associé à la posture de parturition adoptée par la mère, aide à diriger le nouveau-né vers le marsupium ou les mamelles exposées chez les espèces dépourvues de marsupium (Cannon et al., 1976; Hartman, 1920). Un géotropisme négatif pourrait impliquer que le système vestibulaire est assez développé à la naissance pour envoyer des afférences vers le SNC. D'un autre côté, des études sur le développement des réflexes comportementaux chez les marsupiaux, incluant l'opossum *Monodelphis domestica*, ont montré que des réflexes ayant une composante vestibulaire apparaissent quelques semaines après la naissance (Larsell et al., 1935; Pellis et al., 1992 ; Cassidy et al., 1994).

Chez les marsupiaux, notons que même si le système vestibulaire semble encore immature à la naissance (Ashwell et Shulruf, 2014), les cinq organes sensoriels sont généralement présents. L'utricule est le plus développé avec une macule distincte contenant des cellules ciliées et une membrane otolithique déjà présente chez plusieurs espèces, dont l'opossum *Didelphis virginia* (Krause, 1991) et l'opossum *Monodelphis domestica* (Pflieger et Cabana, 1996), chez le wallaby *Macropus eugenii* (McCluskey et al., 2008) et chez le chat marsupial du nord *Dasyurus hallucatus*. Le développement vestibulaire du chat marsupial est légèrement plus tardif par rapport aux autres marsupiaux. À la naissance, le saccule fait encore partie du labyrinthe membraneux et atteint, avec les canaux semi-circulaires, un niveau de développement semblable à l'utricule quelques jours plus tard (Gemmell et Nelson, 1989; 1992). De plus, il a été démontré que les axones innervant l'utricule et les noyaux vestibulaires chez l'opossum *Monodelphis domestica* sont immunoréactifs pour NF200 (lourd neurofilament ~200kDa), soit une protéine indiquant la maturité axonale (Adadja et al., 2013). Ces résultats pourraient suggérer que les cellules ciliées de l'utricule sont connectées avec les neurones formant le complexe vestibulaire au niveau du tronc cérébral à un stade très précoce de développement (P0).

À un niveau plus central, des expériences de traçage neuronal chez l'opossum *Monodelphis domestica* (Pflieger et Cabana, 1996) et le wallaby *Macropus eugenii* (McCluskey et al., 2008) ont montré que MVe, SpVe et LVe, ainsi que le cervelet, reçoivent déjà des afférences vestibulaires primaires à la naissance. Des projections efférentes des noyaux vestibulaires Lve, et dans une moindre mesure MVe et SuVe atteignent aussi la moelle épinière cervicale chez l'opossum (Wang et al., 1994; Pflieger et Cabana, 1996). Chez ces deux espèces, les voies réticulo-spinales sont assez développées à la naissance et peuvent relayer les entrées vestibulaires vers la moelle épinière. La stimulation électrophysiologique du noyau vestibulaire latéral sur des préparations *in vitro* de

l'opossum induit des mouvements des membres antérieurs, suggérant que la voie relayant l'utricule vers la moelle épinière est partiellement fonctionnelle à la naissance (Adadja et al., 2013). Néanmoins, même si une voie entre le labyrinthe, les neurones formant le complexe vestibulaire et la moelle épinière existe à la naissance, on ne sait pas encore si les organes sensoriels vestibulaires sont capables de capter une déformation mécanique à ce stade. Des études électrophysiologiques sur des préparations *in vitro* suggèrent que ce n'est pas le cas (Lanthier\*, Laforge\* et Pflieger, 2022), mais nous allons néanmoins le découvrir en étudiant leurs développements avec Piezo2.

### **1.4.4.3 Développement de la cochlée**

Le développement du système cochléaire débute donc par une période initiale de prolifération et d'extension du plancher du canal cochléaire qui se caractérise par une saillie de l'extrémité ventrale de l'otocyste vers E11 chez la souris (Li et al., 1978). Cette saillie s'allonge sous une forme tubulaire, qui s'enroule sur elle-même au cours du temps, et son extrémité s'éloigne de la vésicule otique au fur et à mesure de la prolifération cellulaire. À E12.5, les cellules se divisent activement et deviennent post-mitotiques à partir de l'apex de la cochlée, c'est-à-dire le point le plus éloigné des régions vestibulaires (Matei et al., 2005; Doetzlhofer et al., 2006). Les cellules de la base deviennent post-mitotiques environ 2.5 jours après celle de l'apex (Ruben, 1967), soit vers E15. La différenciation cellulaire en cellules de soutien ou en cellules ciliées ne survient pas directement après la sortie du cycle mitotique pour toutes les cellules. En effet, les premiers signes de différenciation apparaissent initialement dans les cellules situées près de la base du canal cochléaire – à environ  $1/8^{\circ}$  de la longueur baso-apicale totale -, puis se poursuivent vers la base et enfin vers l'apex (Li et Ruben, 1979; Montcouquiol et Kelley, 2003). Ainsi, les cellules de l'apex commencent à se différencier 5 à 6 jours après être devenues post-mitotiques. Il en résulte que les

premières cellules terminant leur division cellulaire, à l'apex de la cochlée, seront les dernières à se différencier. En revanche, certaines des dernières cellules qui terminent leur division dans la région basale de la cochlée seront les premières à se différencier en cellules de soutien ou en cellules ciliées (Basch et al., 2016).

Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la différenciation des cellules de l'organe de Corti sont encore mal compris. Cependant, il a été démontré que la sécrétion du morphogène SHH - sonic hedgehog - par les neurones du ganglion spiral joue un rôle dans ce processus (Liu et al., 2010; Bok et al., 2013). En effet, le taux de SHH s'élève, puis diminue selon un patron spatial et temporel similaire à celui de la différenciation des cellules ciliées (Matei et al., 2005). Ces variations dans la portion ventrale des otocystes influenceraient l'expression d'Atoh1 (Driver et al., 2013). Il agit à titre de facteur homologue mammalien du gène atonal de drosophile, qui régule la formation des mécanorécepteurs et des photorécepteurs chez ces animaux (Jarman et al., 1993, 1994). Chez les souris embryonnaires génétiquement modifiées pour ne pas exprimer Atoh1, les cellules ciliées ne se développent pas dans l'oreille interne (Bermingham et al., 1999; Pan et al., 2011). La surexpression d'Atoh1 quant à elle est suffisante pour induire des cellules ciliées ectopiques dans des cultures cochléaires (Gubbels et al., 2008; Woods et al., 2004). Atoh1 est un facteur de transcription de type hélice-bouche-hélice de base ou bHLH, qui lui-même initierait la différenciation en cellules ciliées (Chen et al., 2002; Cai et al., 2013). En plus d'Atoh1, l'expression de la myosine VI (MYO6) est une méthode bien établie pour l'identification des cellules ciliées au stade précoce (Hertzano et al., 2008; Kappler et al., 2004; Roux et al., 2009). De plus, de nombreux gènes, dont Pou4f3 et Gfi1, sont exprimés lors du processus de formation et de maturation des cellules ciliées au cours du développement cochléaire. Pou4f3 est un gène essentiel pour la formation des cellules ciliées (Ikeda et al., 2015), tandis que Gfi1 est essentiel pour leur survie

(Hertzano et al., 2004; Wallis et al., 2003). Des études sur des souris et des vertébrés non mammaliens suggèrent que la fonction d'Atoh1, dans la différenciation des cellules ciliées, est modulée par son interaction avec Gfi1 et Pou4f3 (Costa et al., 2017; Yamashita et al., 2018), et ces trois protéines sont exprimées de manière distincte au cours du développement de l'oreille interne dans la cochlée de la souris (Scheffer et al., 2015). Après leurs différenciations, il est possible de distinguer les cellules sensorielles et de soutien en étudiant la région synaptique. En effet, la protéine Otoferlin agit à titre de capteur d'ions calcium impliqué dans la fusion membranaire des vésicules présynaptiques au niveau des synapses en ruban des IHC immatures et matures, permettant de déclencher l'exocytose des neurotransmetteurs. Il est également essentiel à l'exocytose synaptique des OHC immatures chez les souris embryonnaires (Roux et al., 2006; Pangrsic et al., 2010; Al-Moyed et al., 2019). Son expression est ainsi spécifique aux cellules sensorielles cochléaires (Duncker et al., 2013; Heidrych et al., 2009). Finalement, l'observation des filaments d'actine grâce à l'immunofluorescence de la phalloïdine est une autre stratégie largement utilisée pour l'identification de la surface épithéliale des cellules ciliées (McKenzie et al., 2004). Malgré l'élégance de ces nombreuses expériences et des hypothèses qui les accompagnent, les mécanismes moléculaires sous-jacents à la différenciation des cellules sensorielles de l'organe de Corti restent encore mal compris.

Chez la souris à E14.5, la différenciation physiologique des IHC devient évidente par l'apparition d'un faible courant potassique dans la région basale (Marcotti et al., 2003). La différenciation des cellules ciliées internes précède légèrement celle des cellules ciliées externes (Huh et al., 2012). Une demi-journée plus tard, le développement des stéréocils débute, d'abord au niveau des cellules ciliées internes puis des externes (Bulankina et Moser, 2012; Nayak et al., 2007). La synaptogenèse entre les cellules ciliées et leurs fibres nerveuses débute à E16.5 chez la souris et à E18 chez le rat

(Johnson et al., 2005). La maturation de l'organe de Corti se termine à E17 avec les cellules ciliées et les cellules de soutien disposées selon le modèle caractéristique de l'organe de Corti : une rangée de IHC, trois rangées de OHC et plusieurs sous-types de cellules de soutien. À P0, le canal cochléaire aura atteint sa forme mature qui correspond à environ 1.75 tour (Kelley, 2007). Le système auditif est fonctionnel vers l'âge de 2 semaines où l'enregistrement des potentiels évoqués dans le nerf VIII par des stimuli sonores atteint les mêmes valeurs que chez l'adulte (Mikaelian et Ruben, 1965), alors que ceux dans le tronc cérébral demeurent très élevés, mais immatures (Ehret, 1975, 1976a, b; 1977). La maturation auditive du SNC se poursuit jusqu'au sevrage qui correspond à 3 ou 4 semaines de vie (Prichett et Taft, 2007).

La croissance des stéréocils suit un processus chorégraphié dans lequel l'allongement et l'élargissement sont activés à des moments précis. Bien que plus précisément décrit dans la cochlée du poussin (Avenarius et al., 2014; Tilney et al., 1988; Tilney et al., 1992), la croissance des stéréocils des cellules ciliées cochléaires des mammifères suit des étapes séquentielles similaires. Au stade I, les cellules ciliées terminent leurs mitoses et commencent à se différencier. Au stade II, les stéréocils se forment et commencent à s'allonger en forme d'escalier. Chez la souris, les stades I et II se produisent avant la naissance entre E12.5 et E15 (Basch et al., 2016; Doetzlhofer et al., 2006; Matei et al., 2005). À P0.5, les faisceaux de stéréocils ont déjà une forme d'escalier discernable (Krey et al., 2020). Au stade III, l'allongement des stéréocils s'arrête, mais l'élargissement commence, comme dans la cochlée du poussin. Cet élargissement coïncide avec l'apparition de la transduction. Enfin, au stade IV, les stéréocils atteignent leur longueur adulte à P21.5. L'assemblage des faisceaux de stéréocils des vertébrés assure ainsi la détection des stimuli mécaniques (Fettiplace et Kim, 2014).

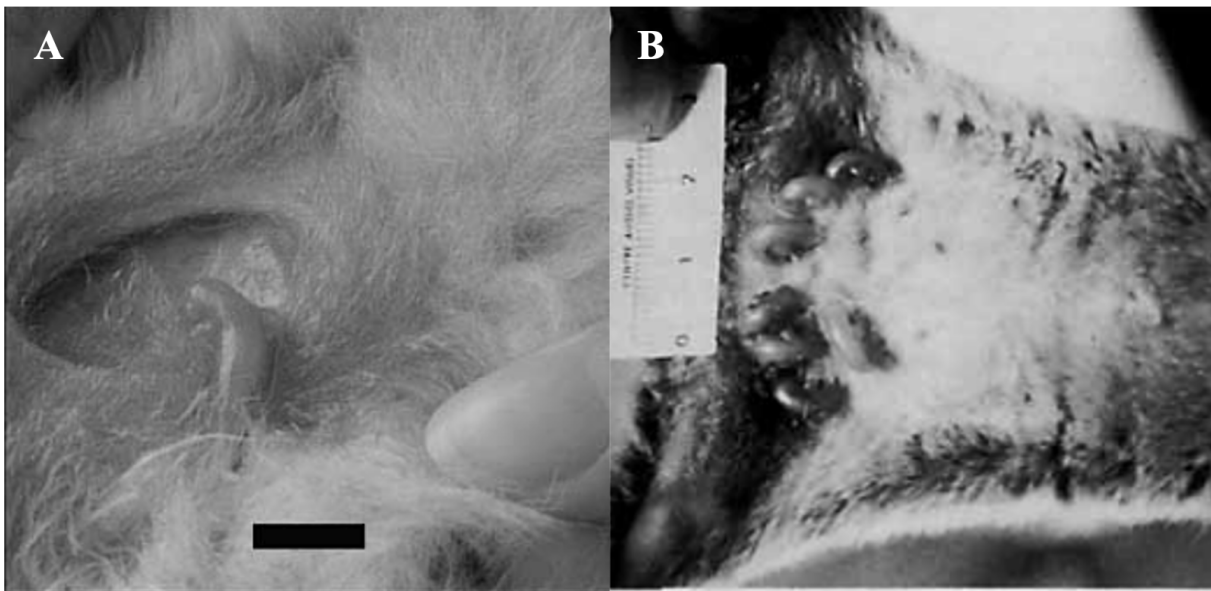
Chez les marsupiaux, les principales étapes du développement morphologique de l'oreille interne s'apparentent à celles des euthériens (Aitkin et al., 1991; Clancy et al., 2007). Néanmoins, les données recensées sur le développement du système cochléaire chez l'opossum *Monodelphis domestica* sont limitées. La majorité des études se concentrent sur le système nerveux central et ont révélé que des synapses d'axones provenant des noyaux cochléaires au niveau du colliculus inférieur étaient observables au jour postnatal (P) 17 et que leur nombre augmentait considérablement à partir de P27. De plus, des potentiels évoqués suite à des stimuli auditifs ont été enregistrés dès P24 dans le colliculus inférieur (Aitkin et al., 1997) et le tronc cérébral (Reimer, 1995), suggérant la fonctionnalité auditive. En se basant sur des techniques histologiques, d'autres chercheurs ont révélé que lorsque la perception auditive de l'opossum *Monodelphis domestica* débute à P24, le méat auditif externe n'est pas encore complètement développé, les osselets de l'oreille moyenne ne sont pas complètement ossifiés et la future caisse du tympan est partiellement remplie de mésenchyme lâche (Sánchez-Villagra et al., 2002). Ces résultats montrent qu'un développement complet des différentes structures anatomiques de l'oreille n'est pas un prérequis à la perception des sons. Avant la réalisation de cette thèse, aucune étude ne s'est, à notre connaissance, penchée sur le développement sensoriel de l'organe de Corti lui-même.

Comme démontré, les étapes importantes de développement des cellules mécanosensorielles et de leurs structures associées dans les systèmes trigéminal, vestibulaire et cochléaire ont largement lieu *in utero* chez la souris. Afin de pouvoir étudier leur développement sans pour autant sacrifier la mère et mieux comprendre le développement de ses sens céphaliques précoces, nous employons comme modèle animal, l'opossum, *Monodelphis domestica*.



## 1.5 Le modèle d'étude, l'opossum *Monodelphis domestica*

L'opossum gris à queue courte, *Monodelphis domestica*, est un marsupial originaire d'Amérique du Sud (Brésil, Bolivie, Paraguay) de la taille d'un petit rat. Le nom marsupial dérive du mot grec *marsupion* signifiant « poche », en référence au marsupium ou la poche marsupiale (Russell, 1982), qui est un repli cutané qui recouvre les tétines sur le ventre des femelles de la plupart des espèces de marsupiaux. Lorsque la poche est complète, comme chez les kangourous ou phalangers (Fig.15A), les tétines sont recouvertes et les petits sont protégés du milieu extérieur. Chez certaines espèces, le marsupium est relativement peu développé, et il est absent chez d'autres espèces comme l'opossum *Monodelphis domestica*, ce qui fait que les nouveau-nés restent exposés et on parle alors de champ marsupial (Fig.15B).



**Figure 15. Nouveau-nés marsupiaux.** (A) Le phalanger renard *Trichosurus vulpecula* avec une poche marsupiale bien développée dont seule l'ouverture est visible et (B) l'opossum gris à queue courte *Monodelphis domestica* sans marsupium. L'échelle en A vaut 1 cm. A tirée de Nelson et Gemmel (2004) et B de Cassidy et al. (1994).

Il s'élève facilement en captivité et se reproduit à l'année longue, l'oestrus étant déclenché chez la femelle par la proximité d'un mâle (Baggot et al., 1987 ; VandeBerg et Williams-Blanguero, 2010). Ce modèle marsupial est employé pour différentes raisons, dont le fait que les petits naissent après une courte période de gestation de 14 à 15 jours (Harder et al., 1993) et que l'aspect général de l'opossum est comparable à un embryon de rongeur âgé entre E10 et E14 ou à un fœtus humain de 6 à 10 semaines (Cassidy et al., 1994 ; Hughes et Hall, 1988 ; VandeBerg et William Blanguero, 2010) (voir tableau 2). Quelles que soient les interventions technologiques appliquées chez l'homme ou la souris, les individus se trouvant à ces stades de développement seraient trop prématurés et ne survivraient pas. Pourtant, les nouveau-nés marsupiaux ont développé une série d'adaptations qui leur permettent de commencer une vie indépendante alors que la plupart des systèmes du corps subissent encore des processus de développement fondamentaux (Smith et Keyte, 2019). Comme une partie du développement des voies sensorielles et motrices, qui se produit dans l'utérus des mammifères placentaires, a lieu post-natalement chez les marsupiaux, ces derniers permettent l'accès à des stades précoces pour des études développementales sans avoir recours à des prélèvements *in utero* invasifs pour la mère. En plus, l'opossum ne montre pas de spécialisation sensorielle ou motrice particulière, ce qui en fait un mammifère généraliste sur le plan sensorimoteur (Cabana, 2000).

### **1.5.1 La naissance et le nouveau-né**

La naissance des opossums a été décrite chez la famille Américaine *Didelphidae*. La mère lèche le sinus urogénital pour ensuite s'asseoir sur sa croupe, habituellement avec la queue tendue devant elle et les hanches soulevées. Quelques gouttes de liquide peuvent tomber du sinus urogénital juste avant que les jeunes en soient expulsés. Le sac amniotique est encore intact à ce moment, il sera rompu par les mouvements du nouveau-né. Lorsqu'ils quittent le canal de naissance, les opossums

s'orientent rapidement de sorte que leur tête soit tournée vers le haut, en direction de la mamelle. À notre connaissance, aucune description détaillée de la naissance chez *Monodelphis* n'a été faite, mais VandeBerg et Williams-Blangero (2010) font une courte description suggérant une grande similitude avec la parturition chez *Didelphis*.

À la naissance, les nouveau-nés mesurent environ 10mm du haut du crâne à la croupe et pèsent environ 100mg (Fadem et al., 1982; Cabana, 2000; Vandeberg et Williams-Blangero, 2010). Comme tous les marsupiaux, l'opossum est glabre et a une peau translucide laissant apparaître certains organes internes (Fig.16). Il ne possède pas de vibrisse ou autre poil, ses yeux sont recouverts d'une fine couche de peau et le pavillon de son oreille est encore replié et fusionné à la peau. Le nouveau-né est recouvert d'une épaisse couche externe de cellule épidermique appelée périderme, censé aider le jeune à résister au dessèchement en plus de lui offrir une protection immunitaire (Smith et Keyte, 2019).

Les membres antérieurs des nouveau-nés sont relativement bien développés avec cinq doigts individualisés et préhensiles qui se terminent par de fines griffes qui leur permettent d'agripper le poil sur le ventre de la mère (Cabana, 2000). Les articulations de l'épaule, du coude et du poignet sont relativement flexibles, mais le coude ne permet pas une flexion complète du bras. Tous les groupes musculaires des avant-bras sont présents, mais immatures, car ils sont composés de myotubes non striés (Martin et Mackay, 2003). L'innervation musculaire est déjà amorcée dans les bras des nouveau-nés, mais les axones moteurs poursuivent leur



**Figure 16. Opossum *Monodelphis domestica* à la naissance.** Crédit photo Stéphanie Lamoureux. Barre d'échelle, 2mm.

développement dans les membres antérieurs et postérieurs sur plusieurs mois après la naissance (Barthélémy et Cabana, 2005). L'ensemble du squelette est sous forme cartilagineuse (Martin et Mackay, 2003).

À la naissance, ou lorsqu'ils sont retirés d'une tétine et manipulés, les nouveau-nés effectuent des mouvements d'extension et de flexion de faible amplitude des membres antérieurs, selon un patron rythmique et alterné. Ces mouvements permettent au nouveau-né de grimper sur le ventre de la mère, de l'orifice urogénital à la tétine où il se fixe en avalant la tétine qui gonfle légèrement dans la bouche, empêchant son retrait (Cabana, 2000; Fadem et al., 1982). Il est possible que les tissus de la bouche fusionnent au moins partiellement avec les tissus épithéliaux mammaires. Les petits qui ne trouvent pas de tétine continuent à grimper et mourront ; la mère peut éventuellement les manger. Le trajet vers la tétine et l'attachement à celle-ci se produit en seulement quelques minutes au total, voire quelques secondes (Vandeberg et Williams-blanger, 2010). Les membres postérieurs sont de courts bourgeons embryonnaires dépourvus d'articulation et immobiles, ils suivent passivement les mouvements du tronc et commencent à se mouvoir au courant de la deuxième semaine. Après environ trois semaines de maturation, le jeune opossum devient capable de se détacher de la tétine, mais ne le fait régulièrement que vers la quatrième semaine, un âge où il est capable de se mouvoir en marchant (Pflieger et al., 1996). Il n'est cependant pas sevré avant la neuvième semaine (Barthélémy et Cabana, 2005).

### **1.5.2 L'état du système nerveux central à la naissance**

Chez l'opossum nouveau-né, le canal central de la moelle épinière est entouré d'une épaisse zone germinative, comprenant des cellules mitotiques, entourées d'une zone intermédiaire composée de petites cellules indifférenciées dont la plupart sont en cours de migration et deviendront la matière grise présumée (Cabana, 2000; Gingras et Cabana, 1999). Le tout est finalement entouré d'une

mince zone marginale pratiquement dépourvue de fibres myélinisées qui deviendront la matière blanche présomptive chez l'animal adulte (Barthélémy et Cabana, 2005 ; Lamoureux et al., 2005). Contrairement aux neurones des cornes dorsales, les colonnes motrices sont bien définies au niveau des renflements cervical et lombosacré de la moelle épinière (Phan et Pflieger, 2013). Il a été démontré que des motoneurones des deux renflements innervent les muscles des bras et des jambes et que cette innervation se poursuit jusqu'à l'âge de 2 mois (Barthélémy et Cabana, 2005). Ces auteurs rapportent une faible présence de jonctions neuromusculaires immatures dans tous les segments des membres antérieurs à la naissance, ainsi que leur quasi-inexistence dans les membres postérieurs ; le nombre de ces jonctions croît de manière importante jusqu'à environ la 5<sup>e</sup> semaine postnatale. Au cours de la même période, dans la moelle épinière : le canal central diminue de taille et devient circulaire, la zone ventriculaire s'amincit alors que l'intermédiaire s'épaissit, vraisemblablement par l'addition et la différenciation de neuroblastes post-mitotiques et de cellules gliales, tandis que la zone marginale augmente en volume (Gingras et Cabana, 1999). La matière grise spinale adopte sa forme typique semblable à un papillon aux ailes déployées vers 5-6 semaines.

Dans la moelle, on observe un gradient rostro-caudal de développement : l'état de maturité du renflement lombosacré montre quelques jours de retard par comparaison avec celui du renflement cervical (Cabana, 2000). Ce gradient est à mettre en parallèle avec le stade de développement des membres chez le nouveau-né, les membres postérieurs étant immobiles à la naissance contrairement aux membres antérieurs. Toutefois, la croissance postnatale des régions caudales est légèrement plus rapide, ce qui fait que cette disparité s'amointrit avec l'âge.

Au niveau encéphalique, toujours chez l'opossum nouveau-né, le néocortex présomptif ne comporte que deux couches cellulaires à la naissance (Saunders et al., 1989 ; Puzzolo et Mallamaci, 2010). Le prosencéphale ventral et le diencephale montrent peu de différenciation nucléaire, à l'exception du noyau latéral de l'hypothalamus. Au niveau du mésencéphale ventral, le faisceau longitudinal médial et la substance noire peuvent être discernés alors que ce n'est pas le cas pour le tectum et le noyau rouge (Holst et al., 1991 ; Wang et al., 1992). Le pont et le cervelet ne sont que très peu développés, ce dernier ayant encore la forme de lèvres rhombiques (Cabana, 2000; Pflieger et Cabana, 1996). Bien que possédant encore une zone germinative assez épaisse, la moelle allongée montre l'état de développement le plus mature de l'encéphale, avec plusieurs noyaux discernables, comme les noyaux moteurs du facial et du trijumeau, le noyau vestibulaire latéral, ou les noyaux principal et spinal du trijumeau.

Des études portant sur l'état de développement des systèmes de projections centrales basées sur l'injection de traceurs neuronaux se sont penchées sur les connexions entre la moelle et l'encéphale chez l'opossum nouveau-né. Les projections descendantes de plusieurs noyaux de la formation réticulée médullaire et pontique atteignent la moelle épinière à la naissance ou moins d'une journée après : les noyaux réticulaires ventraux et dorsaux de la médulla, le noyau réticulaire gigantocellulaire, le noyau réticulaire paragigantocellulaire ainsi que le noyau réticulaire pontique et raphé caudal (Wang et al., 1992). Le noyau rétroambigu, le locus coeruleus putatif et le noyau spinal du trijumeau ont tous également des axones envoyés vers la moelle épinière. L'application de traceurs neuroanatomiques chez l'opossum nouveau-né a montré qu'un faible nombre d'afférences primaires trigéminales atteints le premier segment cervical (Adadja et al., 2013). Les neurones du noyau vestibulaire latéral (LVe) projettent aussi vers la moelle cervicale chez le nouveau-né en voyageant dans le funicule ventral, alors que les projections vestibulospinales à

partir d'autres noyaux vestibulaires (MVe et SpVe) se développent plus tardivement (Pflieger et Cabana, 1996). Les premières voies ascendantes (spino-encéphaliques) en provenance des niveaux thoraciques de la moelle caudale atteignent le tronc vers le 3<sup>e</sup> jour postnatal (Qin et al., 1993).

### **1.5.3 Les sens influençant le nouveau-né**

Les mouvements des membres des tétrapodes demandent une coordination de l'activité des motoneurones, donc des contractions des muscles que ces cellules innervent, afin de permettre leur fonctionnement adéquat lors du cycle moteur. La question n'a pas été étudiée spécifiquement chez les marsupiaux nouveau-nés, mais ces mouvements rythmiques sont probablement générés par des réseaux de neurones spinaux formant des générateurs centraux de rythmes (CPG). Il s'agit de réseaux d'interneurones localisés au niveau des renflements cervicaux et lombosacrés de la moelle épinière qui induisent et coordonnent l'activité rythmique des motoneurones (Grillner, 1975; 1981; Kiehn, 2006). Toutefois, pour soutenir la locomotion, guider le nouveau-né vers la tétine et déclencher les comportements d'attachement à celle-ci, des « inputs » sensoriels céphaliques doivent influencer l'activité des générateurs centraux de rythmes. Or, la nature de ces stimuli est encore mal comprise.

Certains des sens céphaliques peuvent être éliminés assez aisément en raison de leur immaturité chez l'opossum nouveau-né. En effet, les systèmes auditif et visuel montrent un développement anatomique et physiologique trop tardif pour pouvoir jouer un tel rôle. Le premier est mature et fonctionnel lorsque le méat auditif s'ouvre vers 30 jours (Aitkin et al., 1997 ; Sánchez-Villagra et al., 2002). Alors que les axones rétino-fuges du second vont atteindre le chiasma optique à P3 (Taylor et Guillery, 1994), celles des collicules supérieurs ne font contact avec la moelle épinière

cervicale que vers P16 (Taylor et Guillery, 1994; Wang et al., 1992) et les yeux ne s'ouvrent que vers P35 (Cassidy et al., 1994).

Les sens les plus invoqués pour une action sur les comportements moteurs des marsupiaux nouveau-nés sont le goût, l'olfaction et l'équilibre, en plus de la somesthésie faciale (Adadja et al., 2013; Nelson et Gemmell, 2004). Aucune étude, à notre connaissance, n'a évalué le rôle du goût dans les comportements moteurs précoces de l'opossum ou d'aucun autre marsupial. L'olfaction est plus étudiée, mais son rôle à ce niveau reste incertain. Certaines études ont proposé que l'olfaction influence les comportements moteurs précoces des marsupiaux (Schneider et al., 2009), tandis que d'autres montrent qu'elle est fonctionnellement trop immature pour jouer un tel rôle (Adadja et al., 2013; Hour, 2017). La question de l'implication de l'équilibre (système vestibulaire) lors de la naissance est encore discutée. Concernant la somesthésie faciale, elle semblerait suffisamment développée pour influencer les comportements moteurs précoces (Adadja et al., 2013; Desmarais et al., 2016).

En effet, il a été démontré que lorsqu'une pression est appliquée sur le museau de l'opossum *Didelphis*, ce dernier tourne la tête du côté stimulé et enroule sa queue autour d'un objet lors d'un contact (Langworthy, 1928). De concert, des recherches au sein de notre laboratoire sur l'opossum *Monodelphis domestica* ont démontré que la stimulation électrique du ganglion du trijumeau induisait des mouvements bilatéraux et synchronisés des membres antérieurs similaires à ceux exprimés durant la locomotion dès la naissance (Adadja et al., 2013). Des stimulations mécaniques et thermiques appliquées sur les zones d'innervation du trijumeau sur le museau entraînent les mêmes mouvements (Corriveau-Parenteau et al., 2019; Desmarais et al., 2016). Ces résultats suggèrent que le système trigéminal est au moins partiellement fonctionnel à des âges précoces et qu'il influence la motricité spinale. À cet âge, la peau ne contient pas de récepteurs encapsulés,



mais les cellules de Merkel sont particulièrement abondantes dans le museau (Jones et Munger, 1985 ; Desmarais et al., 2016). Le développement des récepteurs encapsulés au niveau de la peau faciale n'est pas documenté.

## 1.6 Problématique

Comme nous l'avons vu, Piezo2 est une composante essentielle au fonctionnement de nombreux mécanorécepteurs, dont les récepteurs tactiles et les cellules ciliées de l'oreille interne. La distribution et la fonction de cette protéine ont surtout été étudiées chez les mammifères euthériens adultes ou à des stades de maturité avancés et, par contraste, son développement est très peu connu. Il n'existe pas d'étude se penchant sur la présence et la distribution de Piezo2 chez les marsupiaux. Ce projet a donc été entrepris pour étudier la distribution de Piezo2 lors du développement en étudiant par RT-PCR, hybridation *in situ* et immunohistochimie, l'expression de Piezo2 de l'opossum *Monodelphis domestica*.

En débutant ce projet, trois hypothèses ont été formulées, chacune concernant un système sensoriel :

1. Comme les afférences du trijumeau, qui relaient les entrées mécanosensorielles faciales (Capra et Dessem, 1992 ; Viana, 2011) sont fonctionnelles chez l'opossum nouveau-né (Adadja et al., 2013 ; Desmarais et al., 2016), nous nous attendions à ce que Piezo2 soit exprimé dans la peau du museau dès la naissance et que son expression croisse avec l'âge.
2. Concernant le système vestibulaire, d'autres études (Pflieger et Cabana, 1996; Ashwell et Shulruf, 2014) ont suggéré que la macule utriculaire est un peu plus mature à la naissance chez les marsupiaux en comparaison de la macule sacculaire et des crêtes ampullaires. Nous posons alors l'hypothèse que Piezo2 serait présent dès la naissance dans la macule utriculaire, que son expression se limiterait aux cellules ciliées et qu'il augmenterait dans les cinq organes sensoriels avec l'âge.

3. Concernant le système cochléaire, la présence de Piezo2 chez les souriceaux vers E16.5 (Johnson et al., 2005), et sa localisation grandement circonscrite aux cellules ciliées externes (Beurg et Fettiplace, 2017; Wu et al., 2017), suggère que Piezo2 devrait être exprimé dans ces cellules à un âge comparable chez l’opossum, soit au moins au cours de la première semaine postnatale.

Ce projet de doctorat permettra de mieux comprendre le fonctionnement des sens haptique, vestibulaire et cochléaire chez les mammifères, en plus d’améliorer la transposition des découvertes faites chez l’opossum à des modèles euthériens.

## Matériels et Méthodes

*La vie est courte, l'art est long.*<sup>2</sup>

– Hippocrate (460 avant J.-C. – 377 avant J.-C), médecin et philosophe

Ce chapitre a pour objectif de décrire en détail les techniques communes aux différentes parties de cette thèse. Afin de décrire l'expression de *Piezo2* au niveau de la tête d'opossums en développement, nous avons examiné l'expression du gène par RT-PCR et hybridation *in situ*, alors que la présence de la protéine a été démontrée par immunohistochimie. Un total de 193 opossums *Monodelphis domestica* a été utilisés pour cette étude.

Les opossums *Monodelphis domestica* utilisés sont issus d'un élevage maintenu à l'animalerie du Département des sciences biologiques à l'Université de Montréal dans des conditions optimisées pour cet animal (Fadem et al., 1982; VandeBerg et Robinson, 1997; Vandeberg et Williams-Blangero, 2010). Les expériences présentées respectent les recommandations du Conseil Canadien de Protection des Animaux et ont été approuvées par le Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux de l'UdeM.

Les opossums adultes peuvent s'avérer agressifs en cohabitation, ils sont donc gardés dans des cages individuelles réparties dans deux pièces séparées selon leur sexe. Pour effectuer les accouplements, les opossums sont placés en couple dans de grandes cages pourvues d'un grillage

---

<sup>2</sup> Hippocrate : Aphorismes 1.1

en métal amovible qui les isole dans leur compartiment respectif. Ils sont maintenus ainsi pour une durée de sept jours afin de permettre aux opossums de s'habituer à la présence de leur partenaire, ce qui diminue considérablement les agressions et déclenche l'oestrus de la femelle.

Le grillage est ensuite retiré afin de mettre les animaux en contact pendant quatre jours avant qu'ils ne soient remis dans des cages individuelles. Douze à quatorze jours suivant leur séparation, la présence de petits est vérifiée quotidiennement sur l'abdomen de la mère pendant une semaine. Cette période correspond au temps de gestation de la femelle. Les premières 24 h suivant la naissance sont considérées comme le jour postnatal 0 ou P0.

## **2.1 RT-PCR avec extraction par colonne de purification**

18 opossums (3 P0, 2 P3, 3 P7, 2 P10, 2 P13, 4 P14 et 2 P15) ont été traités avec la technique de transcription inverse - polymérisation en chaîne (RT-PCR). Les opossums ont été prélevés sur la mère, anesthésiés profondément par hypothermie à une température de  $-20^{\circ}\text{C}$  pour une durée 5 à 15 minutes dépendamment de l'âge et décapités. En raison de la forte kératinisation, la peau a été entièrement retirée de la tête et le reste des tissus ont été immergés dans un tampon d'extraction RLT avec  $\beta$ -mercaptoéthanol ( $\beta$ -ME) et homogénéisés au pied électrique pendant 45 secondes. L'ARNm a été isolé en digérant les tissus avec 10 $\mu\text{L}$  de protéinase K (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) suivis d'une incubation pendant 10 minutes à  $55^{\circ}\text{C}$ . Après une centrifugation de 3 minutes à 10 000 rpm, le supernatant a été pipeté dans un nouveau tube avec de l'éthanol 100%. La solution a été transférée sur des colonnes de purification avant d'être centrifugée pendant 15 secondes. 350  $\mu\text{L}$  du tampon RWT a été ajouté avant de centrifuger la solution pendant 15 secondes. Subséquemment, un mélange de 10 $\mu\text{L}$  de DNase (2.7U/ $\mu\text{L}$ ) et de 70 $\mu\text{L}$  du tampon RDD a été déposé directement sur le gel pendant 15 minutes. Des étapes répétées où nous avons ajouté du tampon RPE + éthanol

suivi de centrifugation permettent de rincer le gel avant d'ajouter 30-50 $\mu$ L d'eau RNA-free directement sur la membrane. Une centrifugation d'une minute permet d'obtenir un échantillon contenant l'ARNm extrait qui sera utilisé pour la transcription inverse en ADNc (Superscript<sup>TM</sup> IV).

L'ADNc obtenu a été amplifié par PCR avec des amorces spécifiques (voir tableau 3). Pour ce faire, un mélange de la matrice d'ADNc diluée a été créé avec 1 $\mu$ L de tampon Taq (10x), 0.5 $\mu$ L de dNTP (10 mM), 1 $\mu$ L de chaque amorce (10  $\mu$ M) et 0.1 $\mu$ L d'ADN Taq polymérase (5 U/ $\mu$ L). Les réactions de PCR ont été réalisées sur un Thermocycleur TProfessional Basic dans les conditions suivantes : dénaturation initiale des ponts hydrogène de l'ADNc à 94°C pendant 5 minutes, suivi de 30 cycles d'élongation des amorces à 94°C pendant 30 secondes, 58°C pendant 30 secondes et 72 °C pendant 30 secondes, puis d'une extension finale de l'ADN à 72°C pendant 30 minutes. Les produits de PCR ont été examinés sur un gel d'agarose à 1% avec un colorant (Life Technologies). Les résultats ont été photographiés avec une caméra digitale (Fusion FX, Vilber Lourmat, MBI Lab Equipment) et analysés avec le logiciel FusionCapt Advance Solo 4 16.08a.

## **2.2 Hybridation *in situ***

Pour les expériences d'hybridation *in situ*, 9 opossums (3 P0, 3 P7, 3 P14) ont été utilisés. Nous nous sommes inspirés du protocole de Wei et al. (2011) pour la souris embryonnaire. Il a toutefois fallu modifier le protocole pour l'opossum à cause de la présence du périoderme, une couche épidermique légèrement plus épaisse retrouvée chez les nouveau-nés. Dans tous les cas, les expériences ont été réalisées sur des spécimens entiers (*whole mount*).

L'ADNc de la tête d'opossum a été synthétisée à partir d'embryons P1 immergés dans 200µL de solution pour stabiliser l'ARN (RNAlater). L'intégrité du tissu a été perturbée en le forçant à travers une aiguille 27G, puis l'ARN a été extrait à l'aide d'un kit d'extraction d'ARN (RNeasy). Un mélange de 1µg d'extrait d'ARN, 2µl d'oligo désoxythymidine (oligo dT) à 0,5µg/µL et 1µL de désoxy nucléoside triphosphate (dNTP) à 60µM a été chauffé à 70°C pendant 5 minutes. La synthèse de l'ADNc a été réalisée en utilisant 1µL de transcriptase inverse M-MuLV, 1µL de tampon de rétrotranscription 10X M-MuLV RT et l'inhibiteur d'ARN murine.

Le modèle a été amplifié en utilisant l'ADNc d'embryons P1 en fonction du niveau d'expression du gène d'intérêt. L'ADN polymérase TOPTAQ a été utilisé avec les amorces décrites dans le Tableau 3 (l'amorce inverse possède le promoteur de l'ARN polymérase T7). Toutes les matrices d'ADN issues de l'amplification ont été purifiées à l'aide d'un kit de purification du produit de PCR. Les plasmides comprenant les promoteurs T7 ont été précipités avec une solution saturée de NaCl et 100% d'éthanol. Les précipités ont ensuite été lavés avec de l'éthanol à 70% avant séchage et redilution dans l'eau.

Pour synthétiser les ribosondes, 500ng de la matrice d'ADN ont été ajoutés à 2µL du mélange de digoxigénine et d'ARN 10X (2µL de tampon de transcription d'ARN 10X RNAPOL, 0.1 µmol de Dithiothréitol (DTT), 20U d'inhibiteur d'ARN murin et 200U d'ARN polymérase T7). Le mélange a été porté à 20µL avec de l'eau et subséquemment incubé à 37°C pendant 3h. Les sondes synthétisées ont été traitées avec 50U de DNase I pendant 30 minutes à 37°C pour éliminer la matrice. Les sondes ont été purifiées sur une colonne G50 à 1 500G pendant 1 minute. Une électrophorèse sur gel a été réalisée pour contrôler la qualité des sondes.

Les embryons d'opossums ont été disséqués et placés dans du paraformaldéhyde 4% pendant 24 heures, puis déshydratés avec une solution méthanol + PBS (solution saline tampon phosphate) de concentrations croissantes (30%, 50 %, 70% et 100%). Afin d'être en mesure de voir le signal émis par la sonde, les tissus ont été javellisés avec 6% de peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 1h dans le noir afin de devenir transparents. Les embryons ont ensuite été lavés trois fois pendant 5 minutes dans une solution de PBST (PBS 1X, Tween 0.1%), puis traités avec 10µL de protéinase K (10µg/ml) pendant 45 minutes. Afin d'arrêter la réaction de dégradation des membranes cellulaires produite par la protéinase K, les tissus ont été placés dans 20µl/ml de glycine froide pendant 5 minutes. Les tissus ont été rincés deux fois pendant 5 minutes dans le tampon PBST à température ambiante avant d'être traités pendant 20 minutes dans l'agent de fixation, soit une solution de paraformaldéhyde 4% (PFA 4%). Les embryons ont ensuite été lavés cinq fois pendant 5 minutes avec le PBST.

La préhybridation permet de stabiliser la double hélice d'ADN à des hautes températures en utilisant un four muni d'une plaque en mouvement continu à 68°C. Pendant les cinq premières minutes, les tissus ont été incubés dans le tampon H1/L1 (Formamide déionisé 100%, 20X SSC pH 4.5, SDS 20%, Tween 20%) suivi de 2h dans le tampon H2 (tampon H1/L1, poudre d'ARN de torula, héparine 100mg/ml). La torula, contenue dans le tampon H2, est riche en ARN qui se fixe afin de diminuer les liaisons non spécifiques de la sonde qui pourrait mener à un fort signal ou bruit de fond. L'hybridation dénature ensuite la sonde avec 1ml du tampon H2 pendant 10 minutes à 80°C. Les tissus incubent le reste de la nuit à 68°C, ce qui permet à la sonde de devenir entièrement linéaire (sans replis ou circonvolution) afin de faciliter sa liaison à l'ARN.



La seconde journée, les embryons ont été lavés trois fois pendant 30 minutes avec le tampon H1/L1, suivi de trois autres fois avec le tampon L2 (moins concentré que H1/L1) et d'une fois avec le tampon L3 (20X SSC pH 4.5, Tween 20%), le tout à 68°C. Les embryons ont ensuite été retirés du four pour revenir à la température de la pièce. Ils ont été embloqués pendant 2h à température ambiante avec 20µl de sérum de chèvre (HIGS) + 20µl de BSA (100 mg/ml) dans 1 ml de TBST avec agitation. Finalement, les échantillons ont été incubés avec le fragment Fab anti-DIG (1 :3000) dans 20µl de sérum de chèvre (HIGS) + 20µl de BSA (100 mg/ml) dans 1 ml de TBST à 4°C pendant la nuit.

La troisième journée débute avec trois lavages de 5 minutes dans du TBST suivi de 6 lavages d'une heure chacun, le tout à température ambiante; les spécimens sont ensuite incubés dans le TBST pendant la nuit à 4°C. La quatrième journée commence avec trois lavages de 5 minutes dans une solution hydratante de NTMT (NaCl 5M, Tris 1M pH 9.5, Tween 20%). L'expression de la sonde est développée en ajoutant un mélange 1µl de NBT + 3.5 µl de BCIP dans 1 ml de NTMT dans l'obscurité pendant plusieurs heures. Le développement peut être poursuivi à 4°C avec du TBST si la coloration n'est pas suffisante. Autrement, le développement est arrêté en lavant les tissus trois fois pendant 5 minutes avec du PBST à 4°C. Toutes les images ont été prises à l'aide d'un capteur CCD Leica DFC450C monté sur un stéréomicroscope Leica M165FC et les images ont été enregistrées à l'aide de l'application Leica 4 (Las V4).

Les expériences chez la souris servent de contrôle positif et permettent une comparaison interspécifique entre les marsupiaux et les euthériens de l'expression de l'ARNm Piezo2 (3 E11.5, 3 E12.5, 4 E13.5). Le gène Gdf10 a été utilisé comme contrôle négatif (3 E12). Les embryons ont été obtenus de souris gestantes suivant une euthanasie au CO<sub>2</sub>.

**Tableau 3.** Amorces spécifiques utilisées dans les expériences en RT-PCR et Hybridation *in situ*.

La séquence en gras correspond au promoteur T7.

Gènes	Animal	Séquence (5'-3')
GAPDH	Opossum	Forward : TAAATGGGGAGATGCTGGAG
	+ Souris	Reverse : GCCAGCATCGAAGGTAGAAG
Piezo2	Opossum	Forward : TCAGTGTGGCCAAGCAAAGA
		Reverse : <b>TAATACGACTCACTATAGGGGGATGGGGAAAAGGCAGGAG</b>
Piezo2	Souris	Forward: TGCAAGTCACCTCACACAAGA
		Reverse : <b>TAATACGACTCACTATAGGGGAGCCATCCGAAGCAGAATG</b>
Gdf10	Souris	Forward : CCAGACAAGATGAACTCCCTTGG
		Reverse : <b>TAATACGACTCACTATAGGGGACTCTCTCCGTTTTGCTTTGA</b>

## 2.3 Immunohistochimie

Un total de 91 opossums a été utilisé pour l'immunohistochimie dirigée contre Piezo2 dans la peau faciale (8 P1, 7 P7, 3 P13, 6 P14, 3 P21, 2 adultes), le système vestibulaire (8 P1, 3 P5, 9 P7, 1 P13, 7 P14, 5 P21) et le système cochléaire (4 P1, 3 P5, 8 P7, 2 P13, 7 P14, 5 P21). En plus de 75 opossums traités contre la phalloïdine répartis entre la peau faciale (3 P0, 3 P7, 4 P14, 1 P21, 2 adultes), le système vestibulaire (4 P0, 5 P7, 4 P9, 3 P10, 3 P11, 3 P12, 3 P13, 4 P14, 3 P21) et le système cochléaire (4 P0, 3 P7, 4 P9, 3 P10, 3 P11, 3 P12, 3 P13, 4 P14, 3 P21).

La phalloïdine est un heptapeptide bicyclique originalement isolé du champignon *Amanita phalloides* (Lynen et Wieland, 1938). Elle est connue pour sa liaison spécifique aux filaments d'actines (Estes et al., 1981, Wieland et Govindan, 1974). Ces filaments s'associent à deux autres polymères du cytosquelette des cellules eucaryotes, soit les microtubules et les filaments intermédiaires, afin de fournir un support mécanique aux cellules (Pollard et Cooper, 2009). Son étude permet de visualiser l'architecture de la majorité des cellules eucaryotes. De ce fait, la phalloïdine est largement utilisée en laboratoire pour les études microscopiques, comme en microscopie électronique sur des cellules vivantes, ou encore en microscopie optique à fluorescence sur des tissus fixés (Melak et al., 2017). Cette dernière technique a été utilisée dans cette étude afin de mettre en évidence les principales structures de la peau, notamment l'épiderme et les poils, ainsi que les composantes de l'oreille interne.

Les opossums, de la naissance à l'âge adulte, ont été préparés comme mentionné précédemment. Les spécimens de 3 semaines (P21) ou plus étaient anesthésiés par isoflurane. Après la décapitation, la peau du crâne a été coupée à l'aide de microciseaux et une craniotomie a été pratiquée pour faciliter la pénétration des tissus par l'agent de fixation, soit une solution de paraformaldéhyde 4%

(PFA 4%) servant à maintenir l'intégrité des tissus. Concernant les spécimens P14 ou plus, la mâchoire et la langue ont été retirées. Après sept jours, chaque tête était transférée dans une solution de sucrose 15 % comme cryoprotecteur, pendant 1 ou 2 jours, puis dans une solution de sucrose 30% pour la même durée. Les spécimens ont ensuite été séparément immergés dans de l'O.C.T (Optimal Cutting Temperature compound, Tissue Tek Sakura), rapidement solidifiés sur glace sèche et subséquemment entreposés à -80 °C. Les tissus ont été débités en coupes d'une épaisseur de 20 µm à l'aide d'un cryostat (LeicaCM3050S) et les coupes apposées une par une sur des lames Superfrost Plus (Fisherbrand) et conservées à 4 °C.

Les étapes du traitement immunohistochimique qui suivent ont été effectuées à la température de la pièce sauf lorsque spécifié autrement. Les coupes ont été d'abord hydratées à l'aide d'un tampon TBST (Tris buffer 0.05 M, NaCl 1.5 %, Triton X-100 0.3 %, pH 7.4) pendant 20 minutes, puis incubées pendant 24h à 4°C dans la solution de TBST contenant les anticorps appropriés à l'expérience (voir tableau 4) et 5 % de sérum normal de chèvre (NGS). Les coupes ont ensuite été lavées trois fois pendant 20 minutes dans la solution de TBST, puis incubées pendant 2h dans la solution de TBST contenant un anticorps de chèvre anti-lapin couplé à un fluorochrome (voir tableau 4). La suite des manipulations a été effectuée dans une pièce à luminosité réduite. Les coupes ont ensuite été lavées trois fois pendant 20 minutes : une fois à l'aide de TBST, puis deux fois à l'aide de TBST contenant quelques gouttes de HCl. Finalement, les coupes ont été recouvertes de Fluoromount G (SouthernBiotech) et d'une lamelle, puis conservées à 4 °C. Les contrôles ont été effectués en omettant l'anticorps primaire afin de valider les résultats. Dans certains cas pour Piezo2, d'autres contrôles ont été réalisés en parallèle en utilisant un antigène Piezo2 pré-absorbé.

Les sections ont été observées avec un microscope équipé pour l'épifluorescence (Leica ebq100 et Nikon eclipse50i) à l'aide de filtres spécifiques pour la fluorescence (vert : 450-490 nm, em : 520nm ou rouge : 560 nm, em : 595 nm). Les microphotographies ont été acquises avec un microscope Confocal Zeiss LSM 800 équipé d'un détecteur Airyscan.

**Tableau 4.** Anticorps primaires et secondaires utilisés dans les expériences en immunofluorescence

Anticorps primaire	Description	Anticorps secondaire associé
Anti-Piezo2	IgG polyclonal de lapin dirigé contre Piezo2 (HPA040616, Sigma-Aldrich) 1:500 FEDENKAAVRIMAGDNVEICMNLDAASFSQHNP	IgG H&L de chèvre dirigé contre le lapin Alexa-Fluor 488 (ab150077, Abcam) 1:500
Phalloïdine	Alexa Fluor 568 Phalloidin (A12380, Invitrogen) 1:10 000	-
PrEST Antigène Piezo2	(APrEST81707, Sigma-Aldrich) antigène : anticorps → 10:1 FEDENKAAVRIMAGDNVEICMNLDAASFSQHNP	IgG H&L de chèvre dirigé contre le lapin Alexa-Fluor 488 (ab150077, Abcam) 1:500
Anti-Piezo1	IgG polyclonal de lapin dirigé contre Piezo1 (HPA047185, Sigma-Aldrich) 1:50 SVVGVVNQPIDVTVTLKLGGEPLFTMSAQQPSI IPFTAQAYEELSRQFDPQPLAMQFISQYSPEDIVT AQIEGSSGALWRISPPSRAQMKRELYNGTADITL RFTWNFQRDLAKGGTVEYANEKH	IgG H&L de chèvre dirigé contre le lapin Alexa-Fluor 488 (ab150077, Abcam) 1:500

---

Liste d'anticorps testés et non spécifiques chez l'opossum *Monodelphis domestica*

---

Anti-Atoh1	<p>IgG de poulet dirigé contre Atoh1 (non commercialisé) 1:10 000 Généreusement offert et formulé par le laboratoire du Dr Driver : <i>National Institute on Deafness and Other Communications Disorders</i> CZRSHRSDGEFSPHSHYSDSDEAS</p>	<p>IgG H&amp;L de chèvre dirigé contre le poulet Alexa Fluor 568 (A-11041, Invitrogen) 1:500</p>
Anti-Atoh1	<p>IgG monoclonal de souris dirigé contre Atoh1 (SAB1412015, Sigma-Aldrich) 1:200 PTPPGSCRTRFSAPASAGGYSVQLDALHFSTFEDSA LTAMMAQKNLSPSLPGSILQPVEENSKTSPRSHRS DGEFSPHSHYSDSDEAS</p>	<p>IgG H&amp;L de chèvre dirigé contre la souris Alexa Fluor 568 (ab175473, Abcam) 1:300</p>
Anti-Myo6	<p>IgG monoclonal de souris dirigé contre Myosin VI (M0691, Sigma-Aldrich) 1:200 UniProt #Q9UM54</p>	<p>IgG H&amp;L de chèvre dirigé contre la souris Alexa Fluor 568 (ab175473, Abcam) 1:300</p>
Anti-Otoferlin	<p>IgG polyclonal de lapin dirigé contre Otoferlin (PA5-52935, Invitrogen) 1:100 PIIVIEIYDQDSMGKADFMGRTRFAKPLVKMADEAY CPPRFPPQLEYYQIYRGNATAGDLLAAFELLQIGPA GKADLPPINGPVDVDRGPIMPVPMGIRPVLSKYRVE VLFWGLRDLKRVNL</p>	<p>IgG H&amp;L de chèvre dirigé contre le lapin CF<sup>TM</sup>488A (SAB4600389, Sigma- Aldrich) 1:500</p>
Anti-Piezo2	<p>IgG polyclonal de lapin dirigé contre Piezo2 (HPA031975, Sigma-Aldrich) 1:100 QFQFFQEAVPPNDYYARLFGIKSVIQTDCSSTWKIIV NPDLN</p>	<p>IgG H&amp;L de chèvre dirigé contre le lapin Alexa-Fluor 488 (ab150077, Abcam) 1:500</p>
Anti-Piezo2	<p>IgG polyclonal de lapin dirigé contre Piezo2 (NBP1-78624, Novus Biological) 1:100 EKKRSAREERKRRRKGSKGEPVEWEDREDEPIKKK SDGPDNIIKRIFNILK</p>	<p>IgG H&amp;L de chèvre dirigé contre le lapin Alexa-Fluor 488 (ab150077, Abcam) 1:500</p>

---

# Chapitre 3

## Résultats

*If you want to understand function, study structure.*<sup>3</sup>

– Francis Crick (1916 – 2004), biophysicien

### 3.1 Peau faciale

#### 3.1.1 Hybridation *in situ*

Chez l’opossum à la naissance (P0), l’expression de l’ARNm de Piezo2 se limite à une région de la face située autour de la bouche et des narines appelée bouclier oral (Fig. 17A, flèches pleines). À ce niveau, l’épiderme est légèrement plus kératinisé que sur la peau recouvrant le reste de la tête et cette région touche le ventre de la mère lorsque le nouveau-né est accroché à une mamelle. Le marquage est légèrement plus intense au niveau de la frontière entre le bouclier et la peau générale (Fig. 17A, flèches pleines), avec une expression plus modérée au niveau du bouclier lui-même. Aucune autre structure ne montre de signal ailleurs dans le corps de l’opossum en raison de la pénétration trop faible de la sonde. Les expériences réalisées sur les animaux à P7 et P14 n’ont pas révélé de marquage pour la même raison.

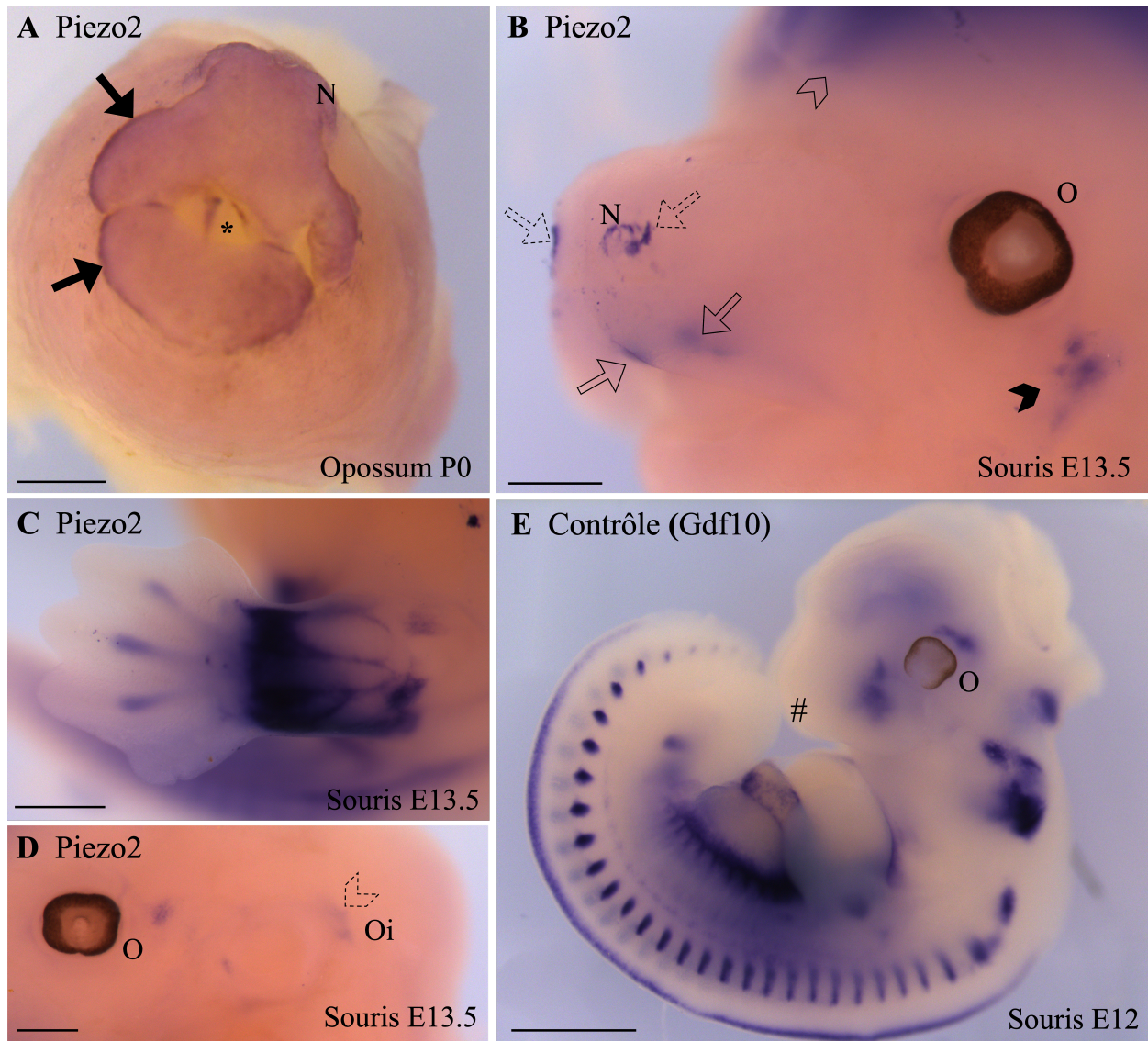
---

<sup>3</sup> Crick, 1988.

Chez la souris à E13.5, un âge sensiblement comparable à celui d'un opossum P0, du marquage est observé dans la peau des lèvres supérieures (Fig. 17B, flèches vides pleines), autour des narines (Fig. 17B, flèches vides pointillées) et vers l'arrière des joues (Fig. 17B, tête de flèche pleine). La peau étant très mince et non kératinisée, du marquage transparait dans les tissus sous-cutanés correspondant à des portions antérieures, soit du crâne, soit de l'encéphale en développement. Du marquage est également observé au niveau des os qui composent le zeugopode et l'autopode des membres antérieurs et postérieurs en développement (Fig. 17C), en plus de l'oreille interne en développement (Fig. 17D, tête de flèche vide pointillée).

Des spécimens contrôle ont été systématiquement traités avec une sonde formulée avec la protéine Gdf10 responsable de la morphogenèse osseuse. Un exemple de contrôle est donné à la figure 17E chez une souris E12 où nous pouvons observer l'absence de signal autour des narines et de la bouche (#) contrairement à la sonde Piezo2 (Fig. 17B).



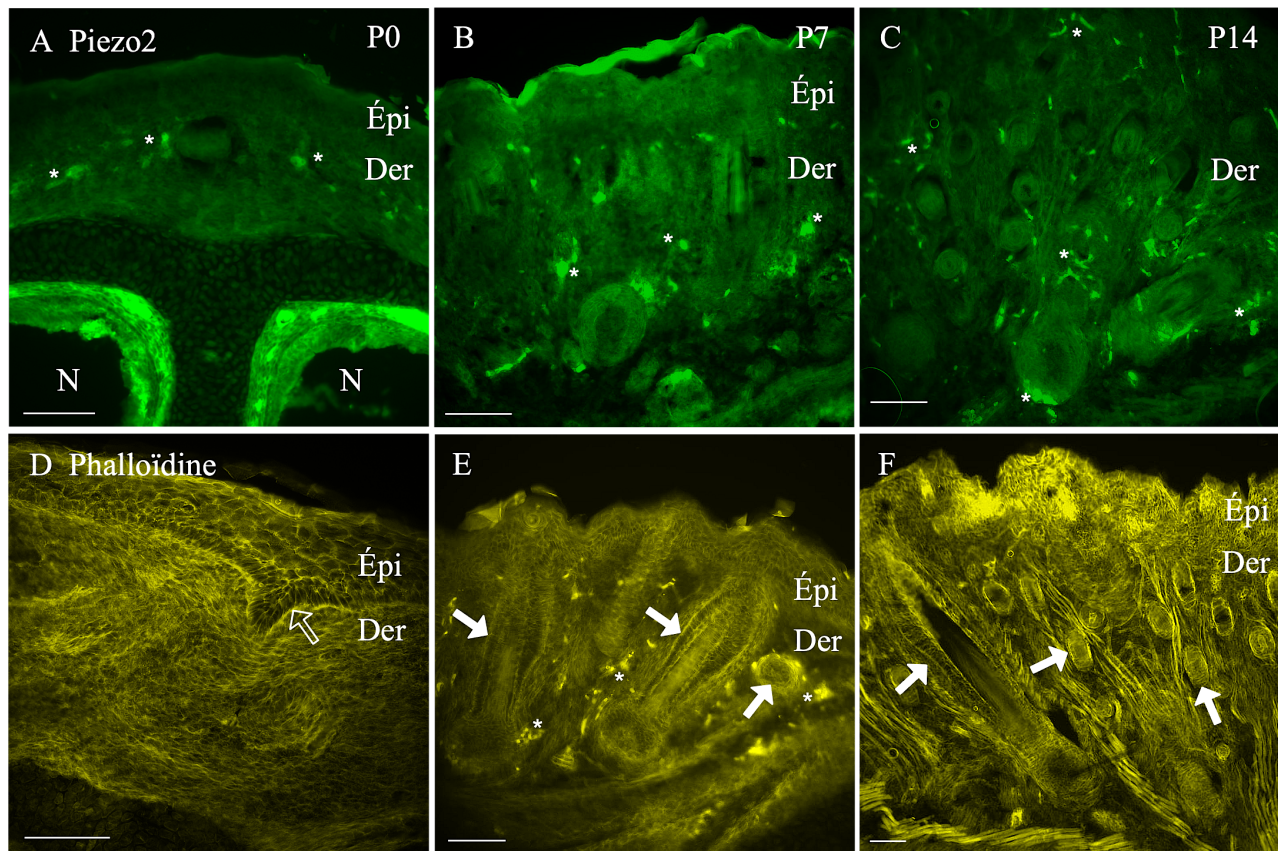


**Figure 17. Hybridation *in situ* de Piezo2.** (A) Opossum à la naissance (P0). Les flèches pleines pointent la périphérie du bouclier oral qui exprime Piezo2. L’astérisque indique la bouche. (B-D) Souris âgée de 13.5 jours embryonnaires (E). Le marquage de l’ARNm Piezo2 est observé dans la peau des lèvres supérieures (flèches vides pleines), autour des narines (flèches vides pointillées), vers l’arrière des joues (tête de flèche pleine) et dans les tissus sous-cutanés correspondant à des portions antérieures, soit du crâne ou de l’encéphale en développement (tête de flèche vide) (B). Il est aussi observé dans les os des membres antérieurs et postérieurs (C) et au niveau de l’oreille interne en développement (tête de flèche vide pointillée) (D). (E) Souris E12 traitée avec une sonde Gdf10 ne montrant aucun signal autour des narines et de la bouche (#) contrairement à Piezo2. N : Narine, O : Œil, Oi : Oreille interne. Barre d’échelle, 500µm.

### 3.1.2 Immunohistochimie

Les expériences d'immunohistochimie dirigées contre Piezo2 ont été réalisées sur des coupes transverses de têtes entières d'animaux de la naissance jusqu'à l'âge adulte. Pour nous assurer de bien discerner les structures auprès desquelles la présence de Piezo2 a été décrite chez d'autres espèces, l'organisation cellulaire de la peau a été mise en relief à l'aide d'un marquage à la phalloïdine (Fig. 18D-F) chez certains spécimens. Dès la naissance, le marquage à la phalloïdine permet de délimiter la frontière entre l'épiderme et le derme qui correspond à la couche germinale épidermique (Fig. 18D). À P7, le développement dans la couche dermique est mis en évidence grâce aux terminaisons périphériques des neurones sensoriels à l'intérieur et autour des follicules pileux (Fig. 18E). Malgré une complexification importante du tégument avec l'âge, comprenant le développement des structures qui sont innervées par des fibres exprimant Piezo2 chez la souris adulte, nos observations n'ont pas révélé de marquage suggérant la présence de Piezo2 chez l'opossum au niveau de l'épiderme et du derme, même chez l'adulte (non illustré). La figure 18A-C montre des exemples typiques de coupes de peau chez des animaux respectivement âgés de P0, P7 et P14. Des résultats préliminaires ont été publiés dans Laforge et Pflieger, 2018.

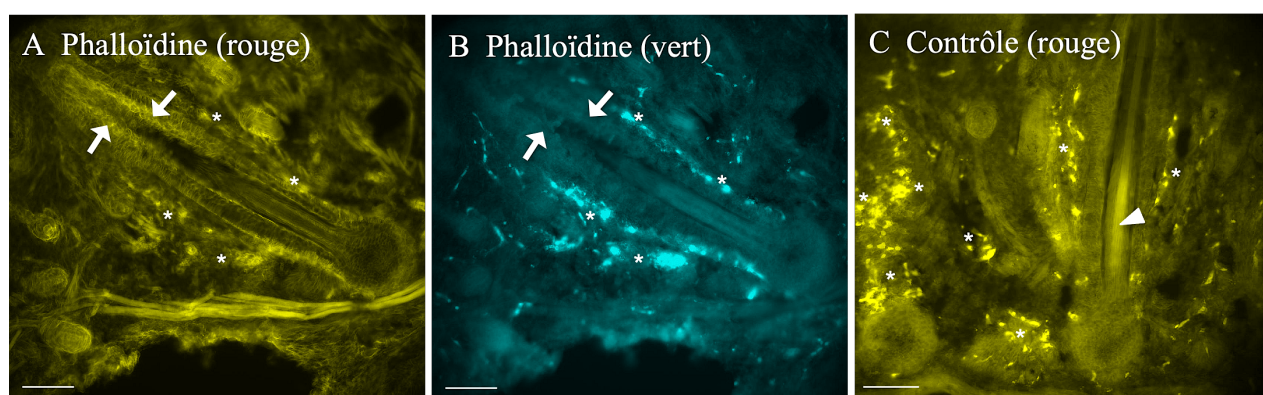
L'absence de marquage immunohistochimique pour Piezo2 dans la peau faciale ne semble pas être due à un problème d'anticorps, car du marquage a été observé dans l'oreille interne sur les mêmes coupes de têtes, traitées dans les mêmes conditions. Les résultats concernant l'oreille font l'objet des sections suivantes.



**Figure 18. Immunohistochimie contre la protéine Piezo2 et la phalloïdine dans la peau du museau d’opossum à différents âges. (A-C)** Coupes transverses d’opossums à P0 (A), P7 (B) et P14 (C). Aucun marquage Piezo2 n’est observé, ni dans le derme ni dans l’épiderme. **(D-F)** Structure cellulaire de la peau à P0 (D), P7 (E) et P14 (F) sur des coupes traitées à la phalloïdine. La flèche vide en D pointe la base de l’épiderme et les flèches pleines en D et F montrent des poils en développement. Toutes les microphotographies ont été prises au même temps d’exposition et sont orientées avec la surface de la peau vers le haut. Les astérisques pointent des vaisseaux sanguins qui émettent une fluorescence intrinsèque. N : Cavité nasale, Épi : Épiderme, Der : Derme. Barre d’échelle, 100µm.



Des coupes contrôle ont été systématiquement réalisées pour tous les échantillons en omettant les anticorps primaires lors de la première incubation. Ces coupes ont été exposées aux anticorps secondaires. Un exemple de contrôle est donné dans la figure 19 où nous pouvons observer le marquage de la phalloïdine dans une section de la peau du museau (Fig. 19A) d'un opossum P14, alors que la série traitée sans anticorps primaire (Fig.19C) est dépourvue de marquage. La figure 19B montre la même section que sur la figure 19A, mais photographiée à l'aide d'un filtre fluorescent non spécifique à Alexa Fluor-568, comme en témoigne l'absence de marquage pour la phalloïdine.

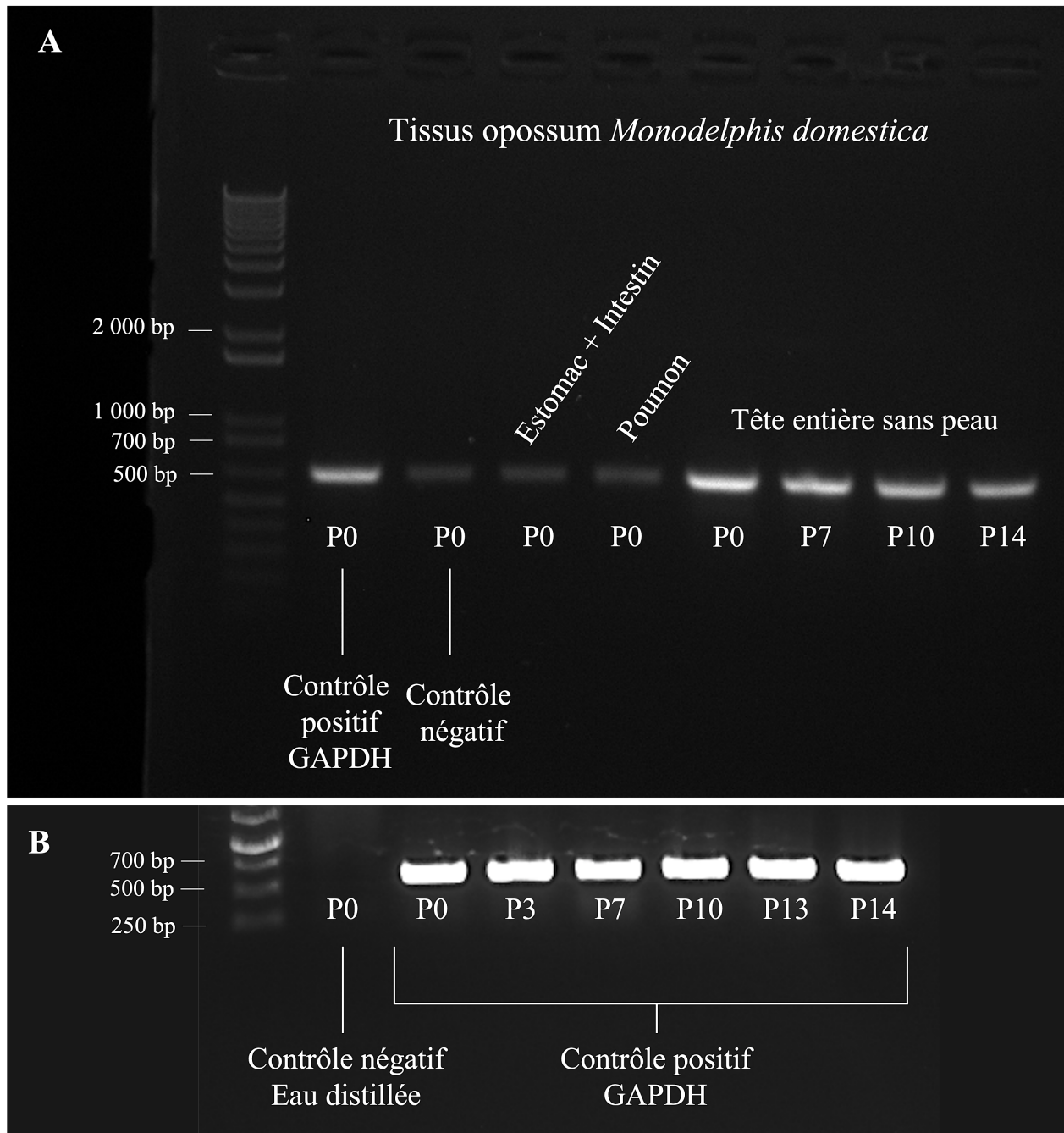


**Figure 19. Contrôle pour l'immunohistochimie de la phalloïdine.** (A-B) Coupe de la peau du museau d'un opossum P14 traitée avec la phalloïdine couplée à un fluorophore. Ce traitement permet d'observer les cellules qui possèdent un cytosquelette bien développé, comme les kératinocytes formant la gaine des poils (flèches pleines). La spécificité du marquage est évaluée en observant les coupes avec un filtre spécifique pour le fluorophore (A, rouge) et un filtre non spécifique (B, vert). Le marquage n'est observable qu'en A. (C) Section adjacente à celle montrée en A, mais non traitée avec la phalloïdine. De la fluorescence intrinsèque à l'intérieur d'un poil est pointée par la tête de flèche. Toutes les microphotographies ont été prises au même temps d'exposition. Les astérisques pointent des vaisseaux sanguins montrant une fluorescence intrinsèque. Barres d'échelle, 100µm.

## **3.2 Système vestibulaire**

### **3.2.1 RT-PCR**

La présence de bandes au poids moléculaire attendu pour Piezo2 a été observée à tous les âges étudiés (Fig. 20A), ce qui suggère que l'ARNm est exprimé dès la naissance dans la tête entière sans peau de l'opossum. Les tissus de l'estomac, de l'intestin et des poumons, reconnus dans la littérature pour ne pas exprimer la protéine Piezo2 chez la souris, ne montrent pas de signal de l'ARNm Piezo2 chez l'opossum. La spécificité des amorces a été testée à tous les âges avec des contrôles négatifs (pour le gène Piezo2 avec les amorces, montré pour P0 sur la Fig. 20A, ainsi que pour le gène rapporteur avec l'eau distillée, montré pour P0 sur la Fig. 20B). La glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été utilisée comme contrôle positif pour valider l'extraction de l'ARNm à tous les âges (Fig. 20B). Les résultats préliminaires sont publiés dans Laforge et Pflieger, 2019.

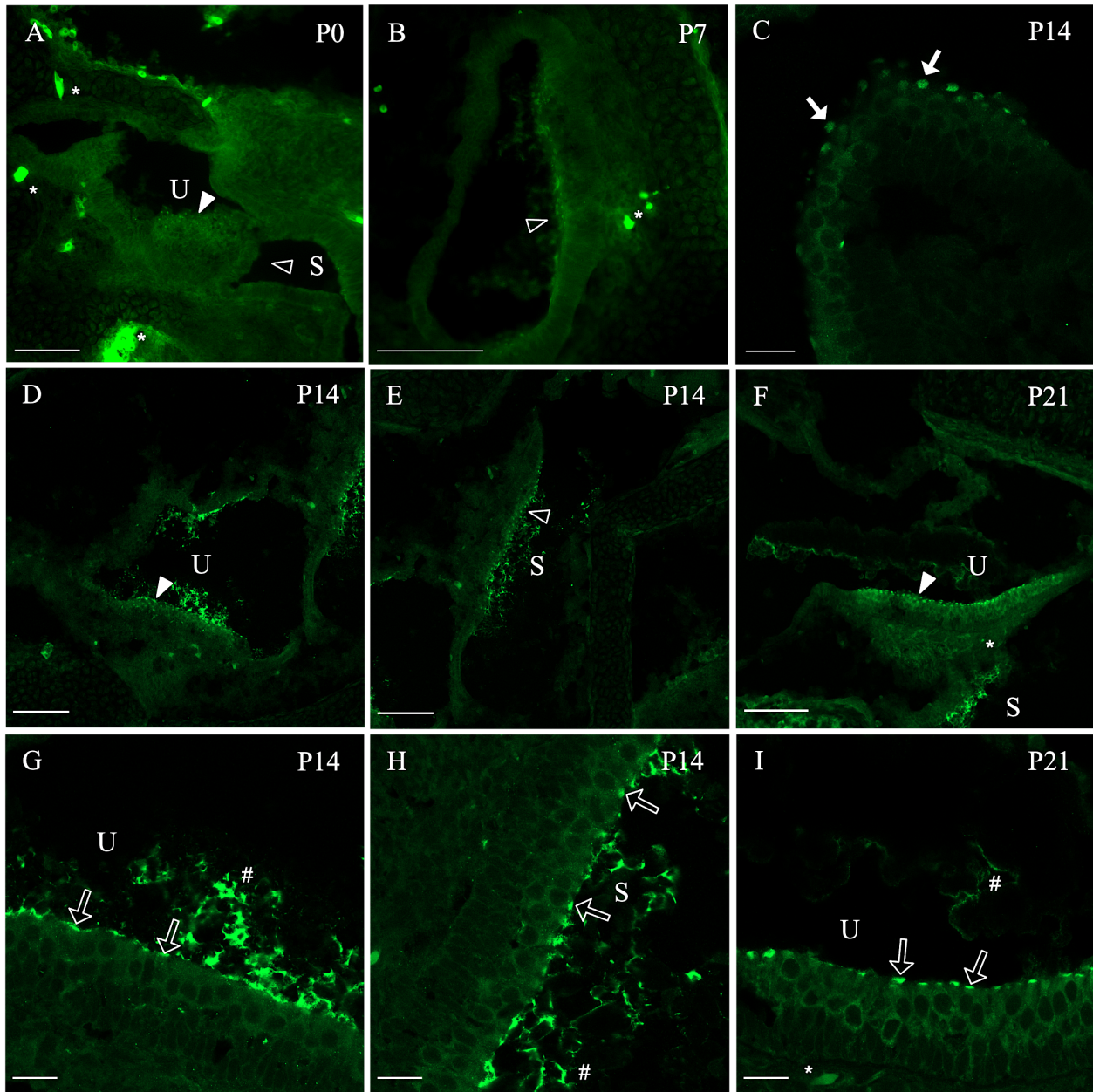


**Figure 20. Présence d'ARNm de Piezo2 dans la tête complète d'opossums sans peau. (A)** Gel de RT-PCR montrant la présence de l'ARNm de Piezo2, à 664 pb. Les tissus ayant servi à l'extraction sont des têtes complètes d'opossums sans peau à différents âges entre P0 et P14. Deux tissus n'exprimant pas Piezo2 sont également présentés; l'estomac et les intestins ensemble, en plus des poumons. Contrôles négatifs avec les mêmes amorces que Piezo2 et contrôles positifs (GAPDH; 640 pb). **(B)** Contrôles négatifs (eau distillée) et contrôles positifs (GAPDH; 640 pb) sur les mêmes échantillons de tissus qu'en A.

### 3.2.2 Développement de Piezo2 dans le système vestibulaire

À la naissance, dans les organes maculaires, le marquage immunohistochimique contre Piezo2 est présent sous forme de faibles disques de fluorescence dispersés sur toute la surface de la macula utriculaire (Fig. 21A, tête de flèche pleine) et est absent de la macula sacculaire (Fig. 21A, tête de flèche vide). À P7, à la fois dans les macules utriculaires et sacculaires, le marquage est présent sous la forme de plaques de fluorescence en forme de disques répartis de manière homogène sur la macula (Fig. 21B). Ils sont plus nombreux et leur intensité légèrement supérieure à ce qui est observé dans l'utricule à P0. À P14, la densité des disques ainsi que l'intensité de fluorescence paraissent avoir augmenté dans les macules (Fig. 21D-E). À P21, le marquage reste similaire à celui observé précédemment (Fig. 21F). Nous n'avons pas compté le nombre de disques, donc ne pouvons déterminer si leur nombre se stabilise entre P14 et P21. À tous les âges, le marquage est limité à la surface apicale de la macula avec un diamètre correspondant à ceux des cellules épithéliales (Fig. 21G-I). La membrane otolithique au-dessus des macules présente également un marquage Piezo2 (Fig. 21B, G-H) qui semble augmenter en intensité jusqu'à P14.

Le marquage Piezo2 apparaît dans les crêtes ampullaires des canaux semi-circulaires à P7 avec un faible marquage à la surface apicale de l'épithélium et les disques bien délimités sont visibles à P14 (Fig. 21C). Le nombre de disques et l'intensité de fluorescence croissent aux âges subséquents comme pour les macules. Contrairement à ce qui est observé pour les membranes otolithiques, la cupule recouvrant les crêtes ampullaires ne présente aucun marquage.



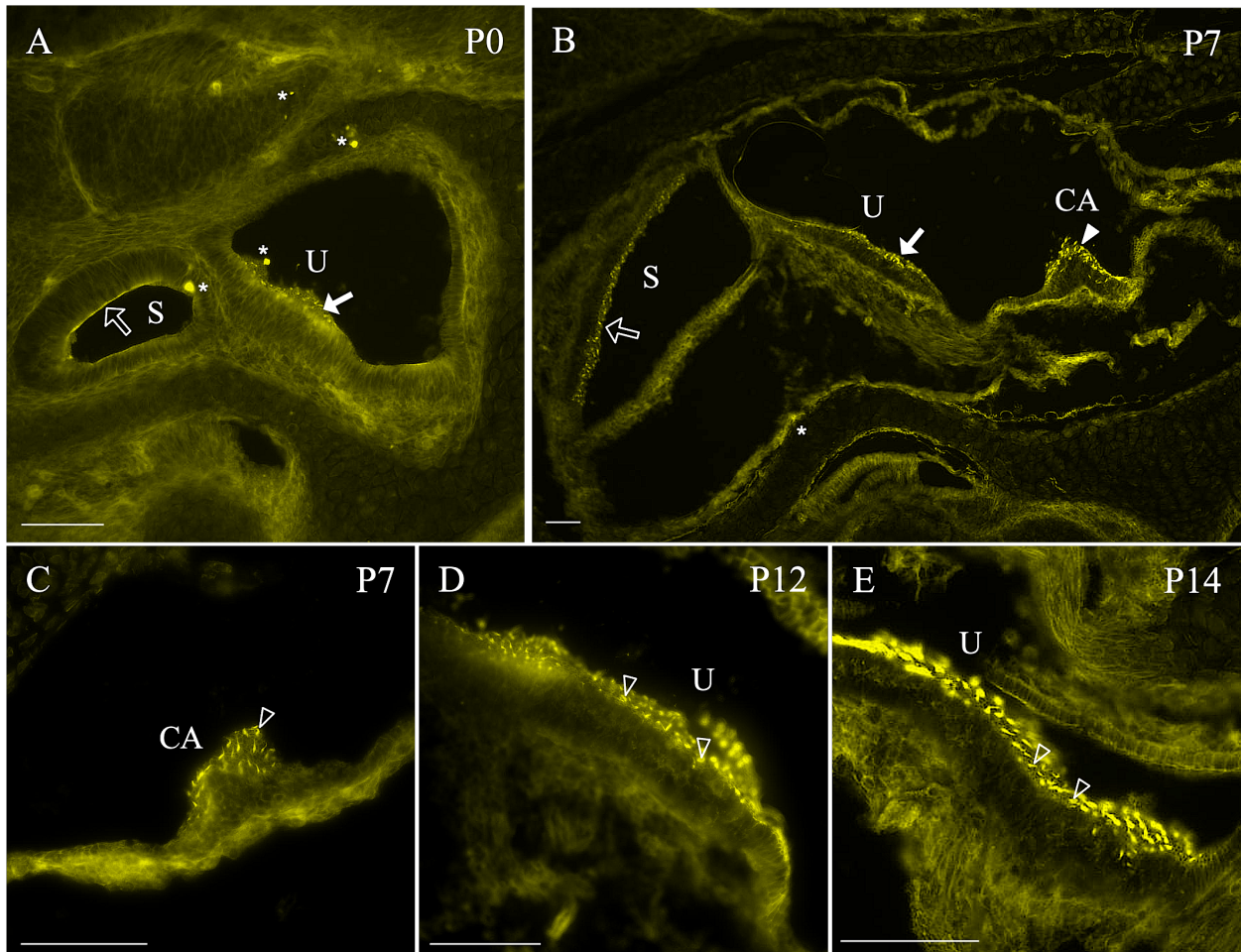
**Figure 21. Expression développementale de Piezo2 dans le système vestibulaire.** (A) Labyrinthe vestibulaire à P0 montrant un faible marquage Piezo2, sous la forme de disques à la surface de l'épithélium, dans la macula utriculaire (têtes de flèches pleines), mais pas dans la macula sacculaire (têtes de flèches vides). (B) À P7, les macules utriculaires et sacculaires expriment Piezo2 sous la forme de disques répartis de manière homogène sur la macula. (C) À P14, les crêtes ampullaires des canaux semi-circulaires présentent du marquage sous forme de disques bien délimités (flèches vides). À P14 et P21, la macula utriculaire (D, F) et la macula sacculaire (E) semblent présenter davantage de disques marqués. Des observations à plus fort



grossissement des macules à P14 (**G, H**) et P21 (**I**) montrent que le marquage (flèches vides) correspond au diamètre apical de cellules, probablement des cellules ciliées. La membrane otolithique au-dessus des macules présente également un marquage Piezo2 (#). Toutes les microphotographies ont été prises au même temps d'exposition et sont orientées dorsal vers le haut. Les astérisques pointent des vaisseaux sanguins qui émettent une forte fluorescence intrinsèque. U : Utricule, S : Saccule. Barres d'échelle, 100µm en A-B, D-F; 20µm en C, G-I.

### 3.2.3 Développement des faisceaux de stéréocils du système vestibulaire

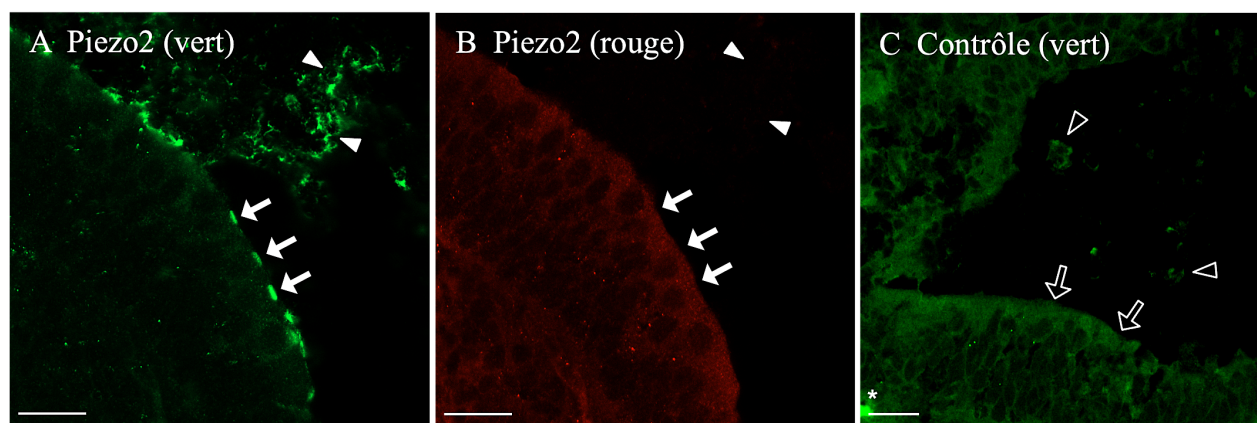
Nous avons utilisé le marquage à la phalloïdine pour étudier le développement des stéréocils au niveau des organes sensoriels vestibulaires. À la naissance, du marquage est visible sur le pourtour des cellules épithéliales, notamment au niveau apical. Le marquage apical est plus intense au niveau des organes maculaires présomptifs : au niveau de la macule utriculaire (Fig. 22A, flèche pleine), il prend la forme de disques pleins à la surface de l'épithélium, ce qui semble correspondre au diamètre des cellules individuelles, alors qu'au niveau de la macule sacculaire (Fig. 22A, flèche vide), il forme un trait généralement ininterrompu. Les crêtes ampullaires des canaux semi-circulaires montrent un faible marquage (non illustré). À P7, le marquage ressemble à ce qui est observé dans la macule utriculaire à P0 (Fig. 22B), c'est-à-dire des disques apicaux pleins du diamètre d'une cellule. Toutefois, l'intensité de la fluorescence semble supérieure à ce qui est observé dans l'utricule à P0 et le contour des disques est plus net. Ce type de marquage est visible au niveau des deux macules. Le marquage des crêtes ampullaires est plus avancé sous la forme de longs filaments à la surface apicale de l'épithélium sensoriel (Fig. 22C), suggérant la présence de cils à l'extrémité des cellules ciliées présomptives. Ce qui ressemble aux cils courts et minces des macules utriculaires et sacculaires observés au niveau des disques à P12 (Fig. 22D) s'allonge et s'épaissit considérablement à P14 (Fig. 22E). Le même patron de fluorescence a été retrouvé à P21 autant pour les macules que les crêtes ampullaires des trois canaux semi-circulaires.



**Figure 22. Immunohistochimie contre l'actine dans les organes sensoriels du système vestibulaire.** Coupes transverses de têtes d'opossums âgés de P0 à P14. **(A)** À P0, le marquage est plus intense à la surface apicale des organes sensoriels. Il prend la forme de disques à la surface de la macule utriculaire (flèches pleines), mais a une apparence plus uniforme à la surface de la macule sacculaire (flèches vides). **(B)** À P7, en plus des macules, les crêtes ampullaires des canaux semi-circulaires (têtes de flèches pleines) montrent un fort marquage. Dans les macules, celui-ci prend la forme de nombreux disques apicaux comme dans la macule utriculaire à P0. **(C)** Dans les crêtes ampullaires, le marquage a la forme de filaments à la surface apicale de l'épithélium sensoriel, suggérant la présence de longs cils (têtes de flèches vides). **(D)** À P12, les cils des macules utriculaires et sacculaires semblent encore courts et minces au niveau des disques. **(E)** Dès P14, l'allongement et l'épaississement des cils présomptifs des macules sont notable. Les microphotographies ont été prises au même temps d'exposition et sont orientées dorsal vers le coin

supérieur droit. Les astérisques pointent des vaisseaux sanguins qui émettent une fluorescence intrinsèque. U : Utricule, S : Saccule, CA : Crête Ampullaire. Barres d'échelle, 100µm.

La présence de marquage dans les membranes otolithiques était inattendue et une attention particulière a été portée aux coupes contrôles pour s'assurer de sa spécificité. La figure 23 montre une macule utriculaire traitée contre Piezo2 et observée avec un filtre spécifique pour le fluorophore Alexa Fluor-488 (Fig. 23A) et un filtre non spécifique (Fig. 23B). Le marquage à la surface de la macule (flèches pleines) et dans la membrane otolithique (têtes de flèches pleines) n'est observable qu'avec le filtre spécifique. Une coupe adjacente de la même macule, traitée sans l'anticorps primaire et observée avec le filtre spécifique, ne montre pas de marquage au niveau de la macule (flèches vides) et une fluorescence au niveau de la membrane otolithique (têtes de flèches vides) dont l'intensité est beaucoup plus faible que sur les coupes traitées avec l'anticorps primaire. Les coupes traitées avec les anticorps pré-absorbés ont produit des résultats similaires aux contrôles négatifs (non illustrés).



**Figure 23. Contrôle négatif pour l'immunohistochimie Piezo2.** (A-B) Macule utriculaire d'un opossum P7 traitée avec l'anticorps anti-Piezo2 et observée avec un filtre spécifique pour le fluorophore (A, vert) et un filtre non spécifique (B, rouge). Les flèches et les pointes de flèches pointent respectivement à la surface de la macula et de la membrane otolithique. Le marquage n'est observable qu'en A. (C) Section adjacente à celle montrée en A, mais traitée sans l'anticorps primaire. Aucun marquage n'est observé à la surface de la macula (flèches vides) avec le filtre spécifique. Les pointes de flèches vides pointent une légère fluorescence de la membrane otolithique. Toutes les microphotographies ont été prises au même temps d'exposition et sont orientées dorsal vers le coin supérieur droit. Les astérisques pointent des vaisseaux sanguins qui émettent une fluorescence intrinsèque. Barres d'échelle, 20 $\mu$ m en A-B, 40 $\mu$ m en C.

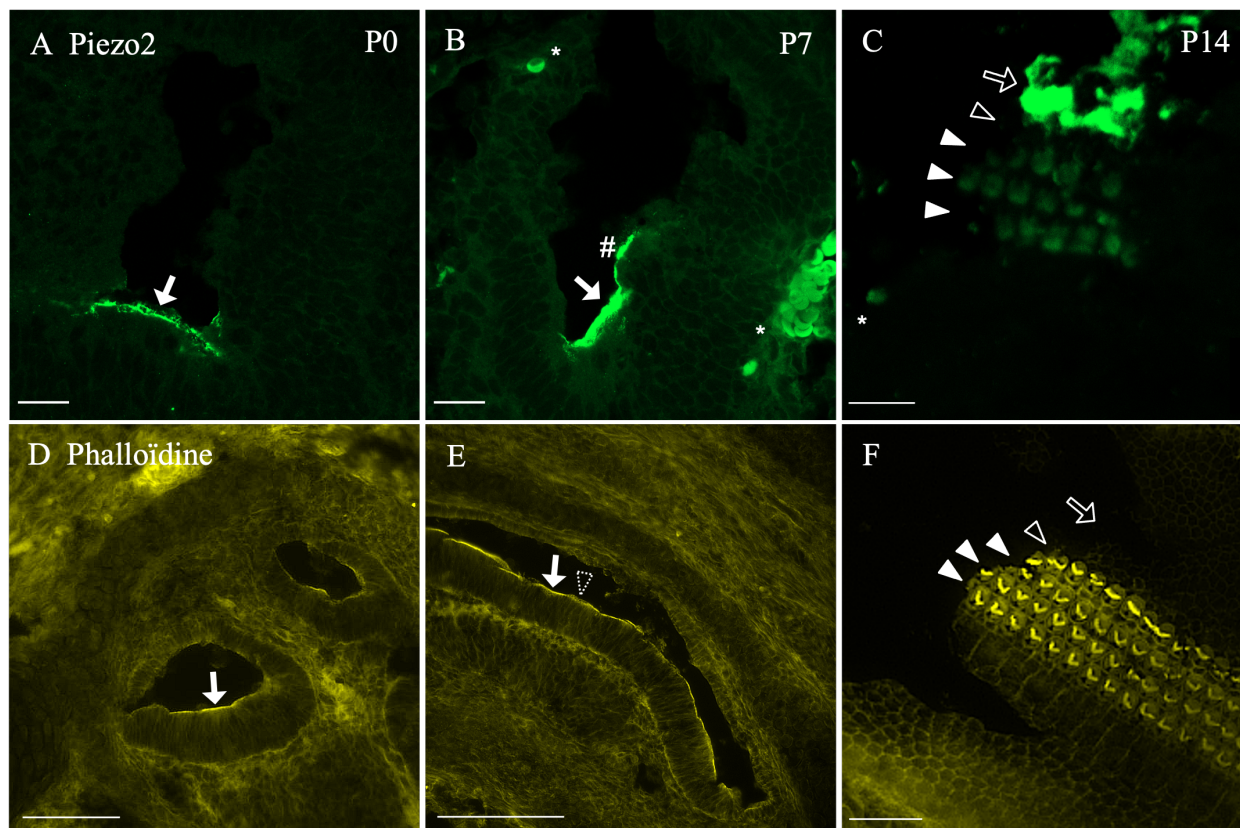
### 3.3 Système cochléaire

#### 3.3.1 Développement de Piezo2 dans le système cochléaire

L'état de maturation de la cochlée varie grandement entre la naissance et P14. Sommairement à P0, elle prend la forme circulaire caractéristique de la vésicule otique (voir section 1.4.4.1). En absence de coloration ou de marquage spécifique, la paroi ventrale et dorsale ne semble montrer aucune distinction apparente. Une série de modifications morphologiques est observable à P7, ce qui inclut un épaissement important de la paroi ventrale de la vésicule, suggérant un développement plus avancé. Dès P9, nous pouvons observer la membrane tectoriale présomptive qui surplombe la région apicale. De plus, les structures entourant l'organe de Corti en développement se raffinent également avec un conduit cochléaire séparé de la rampe vestibulaire et de la rampe tympanique. À P11, la portion ventrale du conduit cochléaire est divisée en plusieurs couches distinguables, correspondant fort probablement aux cellules sensorielles et aux cellules de soutien. Entre P14 et P21, l'organisation générale de la cochlée ressemble à ce qui a été observé précédemment. Néanmoins, sa taille augmente singulièrement.

La distribution de Piezo2 lors du développement de la cochlée a été étudiée par immunohistochimie sur des coupes de tête entière. À la naissance, un fort marquage Piezo2 a été observé sous la forme d'une ligne continue circonscrite au niveau apical d'une portion de l'épithélium du canal cochléaire (Fig. 24A, flèche pleine) qui correspond à la zone présomptive de développement de l'organe de Corti (voir section 1.4.4.1). À P7, le marquage Piezo2 est d'une intensité supérieure à ce qui a été observé à P0 (Fig. 24B, flèche pleine). La morphologie de l'organe de Corti présomptif s'est légèrement modifiée et montre, chez certains spécimens au moins, un bourrelet central à l'emplacement du limbe spiral (Fig. 24B, #), soit une structure contenant des cellules qui produisent

la membrane tectoriale. Cette dernière n'est pas encore présente à cet âge. À partir de P14, Piezo2 ne forme plus une ligne continue à la surface apicale de l'épithélium, mais prend la forme de disques qui correspondent au diamètre des cellules ciliées (Fig. 24C). Ces disques permettent de reconnaître trois rangées de cellules (Fig. 24C, têtes de flèches pleines) qui correspondent aux cellules ciliées externes de l'organe de Corti. L'identification des cellules est permise par la morphologie des faisceaux de cils (voir section 1.4.2) et leur positionnement périphérique sur l'organe de Corti (illustré à P21 à la Fig. 25A, tête de flèche pleine). Les cellules ciliées internes n'expriment pas Piezo2 (Fig. 24C, tête de flèche vide). À P14, la membrane tectoriale est bien visible et fortement marquée (Fig. 24C et Fig 25A, flèche vide).



**Figure 24. Développement de Piezo2 et des cils dans les cellules ciliées de la cochlée.** La rangée du haut (A-C) montre des coupes marquées pour Piezo2 (en vert) et celle du bas (D-F) des coupes marquées pour l'actine (en jaune). (A et D) Canal cochléaire à P0 avec des flèches pleines pointant l'épithélium ventral correspondant à l'organe de Corti présomptif où les cellules expriment du marquage pour Piezo2 (A) et les filaments d'actines (D). (B et E) À P7, les cellules sensorielles présomptives semblent démontrer une plus forte expression de Piezo2. Un bourrelet central à l'emplacement du limbe spiral (#), soit une structure contenant des cellules qui produisent la membrane tectoriale, peut être observé (B). Le marquage apical pour l'actine montre des discontinuités (tête de flèche vide pointillée) qui suggèrent une réorganisation du cytosquelette à ce niveau des cellules concernées (E). (C et F) Coupes rasantes de la surface de l'organe de Corti à P14. Le marquage pour Piezo2 prend la forme de disques sphériques sur trois rangées (C, têtes de flèches pleines) correspondant aux rangées de OHC (voir F). Du marquage est observé sur une portion de la membrane tectoriale (C, flèche vide), mais pas à l'emplacement présumé des IHC (C, têtes de flèches vides). Le marquage des filaments d'actine permet de reconnaître les faisceaux de cils en forme de V formant un angle aigu chez les OHC (F, têtes de flèches pleines) et un angle obtus chez les IHC (F, têtes de flèches vides). Pour faciliter la comparaison avec C, l'emplacement

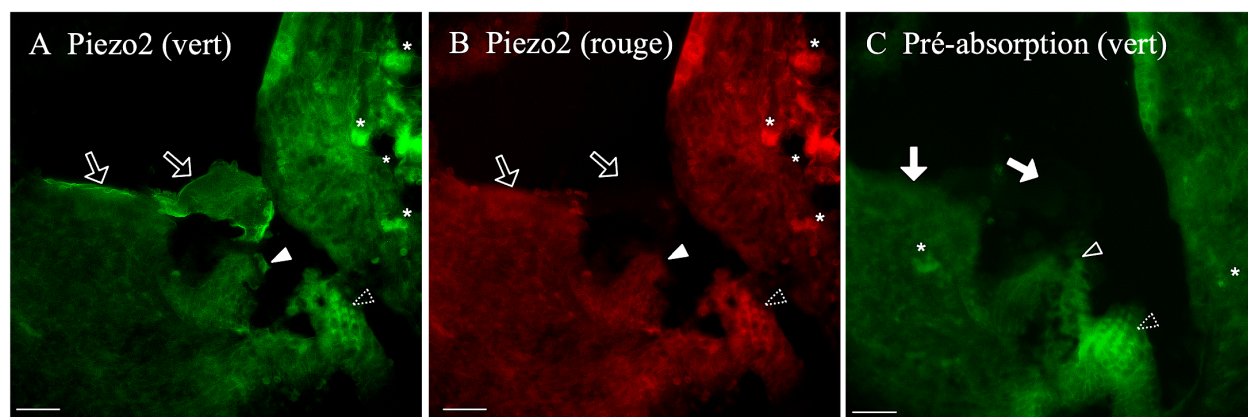


présupposé de la membrane tectoriale est indiqué par une flèche vide. Toutes les microphotographies ont été prises au même temps d'exposition et sont orientées dorsal vers le haut. Les astérisques pointent des vaisseaux sanguins intrinsèquement fluorescents. Barres d'échelle, 20µm en E; 100µm en A-D, F.

### **3.3.2 Développement des faisceaux de stéréocils de l'organe de Corti**

Pour s'assurer que le marquage Piezo2 observé précédemment correspond bien aux cellules ciliées, des coupes d'oreille interne d'opossums aux mêmes âges ont été traitées avec la phalloïdine pour faire ressortir l'organisation du cytosquelette, en particulier au niveau des cils. À tous les âges, la phalloïdine marque faiblement les contours des cellules de l'épithélium de la cochlée présumptive et plus intensément au niveau apical. À P0, le marquage apical forme des portions continues à différents endroits du pourtour de la cochlée, particulièrement dans la région ventrale caractérisée par des cellules de plus haute taille (Fig. 24D, flèche pleine) où se développe l'organe de Corti. À P7, le marquage apical se restreint à la surface apicale des cellules de plus haute taille et il est toujours continu dans l'ensemble (Fig. 24E, flèche pleine), même s'il se fragmente pour laisser apparaître des régions isolées correspondant à la surface des cellules individuelles (Fig. 24E, tête de flèche vide pointillée). Vers P9, une rangée de cellules ciliées internes peut être identifiée grâce à leur forme. À ce stade, les cellules épithéliales de la région externe semblent uniformes et les cellules ciliées externes ne peuvent pas être identifiées. Cependant, elles deviennent distinguables entre P10 et P11. Le marquage à la phalloïdine met en relief les faisceaux de cils reconnaissables en forme de « V ». L'angle aigu du V permet de distinguer les trois rangées de cellules ciliées externes (Fig. 24F, têtes de flèches pleines) de la rangée unique de cellules ciliées internes dont l'angle est plus obtus (Fig. 24F, têtes de flèches vides) comme mis en évidence à P14 (Fig. 24F).

La présence de Piezo2 au niveau de la membrane tectoriale (Fig. 25A, flèches vides) est intrigante, car il s'agit d'une protéine considérée comme un récepteur membranaire alors que la membrane est acellulaire. Le marquage semble spécifique, car il n'apparaît pas sur les contrôles négatifs (traités sans anticorps primaires; non illustrés) et qu'il disparaît au niveau de la membrane tectoriale (flèches vides) et de la surface apicale des OHC (têtes de flèches pleines) lorsque les coupes sont observées avec un filtre inadéquat pour l'Alexa Fluor-488 (Fig. 25B). Toutefois, pour nous assurer qu'il ne s'agit pas d'un artefact méthodologique, des contrôles avec des anticorps préalablement saturés avec Piezo2 (pré-absorption) ont été réalisés. Les coupes traitées avec ces anticorps ne montrent pas de marquage ni dans la membrane tectoriale (Fig. 25C, flèches pleines) ni dans les cellules ciliées (Fig. 25C, tête de flèche vide).



**Figure 25. Spécificité des anticorps dirigés contre Piezo2.** (A-B) Organe de Corti d'un opossum à P21 traité avec l'anticorps anti-Piezo2 et observé avec un filtre spécifique pour le fluorophore (A, vert) et un filtre non spécifique (B, rouge). Les flèches vides et les têtes de flèches pleines pointent respectivement la localisation de la membrane tectoriale et de la rangée de IHC. (C) Section adjacente à celle montrée en A, mais traitée avec l'anticorps anti-Piezo2 pré-absorbé, c'est-à-dire préalablement saturé avec l'antigène. Aucun marquage n'est observé au niveau de la membrane tectoriale (flèches pleines) ni au niveau des IHC (têtes de flèches vides) lorsqu'elles sont exposées au filtre adéquat. Toutes les microphotographies ont été prises au même temps d'exposition et sont orientées dorsal vers le haut. Les astérisques pointent des vaisseaux sanguins tandis que les têtes de flèches vides pointillées montrent des portions autofluorescentes de cellules de soutien. Barres d'échelle, 40 $\mu$ m.

# Chapitre 4

## Discussion

*The important thing is to never stop questioning.*<sup>4</sup>

– Albert Einstein (1879 – 1955), physicien théoricien

Dans cette thèse, nous avons étudié la présence du canal mécanosensible Piezo2 dans la tête de l’opossum (*Monodelphis domestica*) entre la naissance et la fin de la 3<sup>e</sup> semaine postnatale. En utilisant la RT-PCR, nous avons montré que l’ARNm de la protéine est présent à tous les âges étudiés. L’hybridation *in situ* suggère la présence d’ARNm au niveau du bouclier oral à la naissance. Toutefois, aucune autre structure ne montre de signal en raison de la pénétration trop faible de la sonde. L’immunohistochimie n’a pas permis de mettre en évidence la protéine Piezo2 au niveau de la peau faciale, ni chez les jeunes animaux ni chez l’adulte. Cette technique nous a cependant permis de mettre en évidence Piezo2 dans l’oreille interne : la protéine est présente dès la naissance dans la macule utriculaire et l’organe de Corti, elle est observable dans la macule sacculaire et les crêtes ampullaires à P7. Dans tous ces organes, à partir de P7, le marquage pour Piezo2 prend la forme de disques à la surface de l’épithélium. Ces disques ont une morphologie similaire à ceux formés par l’accumulation d’actine où se développent les cils des cellules ciliées,

---

<sup>4</sup> Einstein, 1955.

ce qui permet de penser que Piezo2 se trouve à la surface des cellules ciliées présomptives. Ceci est corroboré dans l'organe de Corti à P9, où le patron de marquage Piezo2 correspond à la distribution en rangée des cellules ciliées internes et à P11 avec les trois rangées des cellules ciliées externes. À P14, les disques de marquage Piezo2 sont bien nets dans tous les organes et la seule différence avec P21 semble être une augmentation de leur nombre. Nous n'avons toutefois pas tenté de quantification. Du marquage Piezo2 est observé dans la membrane tectoriale de l'organe de Corti à partir de P14, et dans les membranes otolithiques des macules dès P7.

#### **4.1 Considérations méthodologiques**

La présence de Piezo2 dans la peau chez d'autres espèces est bien démontrée, au moins chez l'adulte, alors que nos résultats en immunohistochimie ne montrent pas de marquage. Cela amène la question de la spécificité de l'anticorps utilisé, d'autant plus qu'il n'existe pas d'anticorps commercial ciblant spécifiquement la protéine de l'opossum. Différentes observations permettent de conclure que cet anticorps marque bien Piezo2. Premièrement, le marquage observé à la surface des cellules ciliées présomptives des organes sensoriels de l'oreille interne correspond à l'emplacement de Piezo2 dans ces structures chez d'autres espèces (Wu et al., 2017). Deuxièmement, des vérifications à l'aide de l'outil BLAST du *National Centre for Biotechnology Information* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) rapportent 97% de similitude entre l'immunogène employé pour produire l'anticorps utilisé dans cette thèse et la séquence de Piezo2 chez l'opossum. Enfin, deux types de contrôles négatifs ont été employés : l'omission de l'anticorps primaire et l'emploi d'anticorps préalablement saturé avec l'antigène ayant servi à sa production (pré-absorption). Dans ces deux cas, les coupes contrôles ne montraient pas de marquage alors que des coupes adjacentes, traitées avec l'anticorps primaire anti-Piezo2 non saturé, en montraient au niveau de l'oreille interne.

Par ailleurs, la présence potentielle de Piezo2 dans la tête de l'opossum néonatal est soutenue par les expériences de RT-PCR. La région amplifiée par les amorces avec cette technique se trouve dans la séquence codante, soit la partie du gène potentiellement traduite en protéine Piezo2, ainsi que dans sa région 3'-UTR adjacente. L'amplification de l'expression génique survenue à tous les âges au poids moléculaire attendu permet d'affirmer avec confiance que l'opossum exprime l'ARNm de Piezo2 et qu'il est possiblement traduit en protéine, au moins dans l'oreille interne.

Concernant l'hybridation *in situ* sur animal entier, nos résultats chez la souris suggèrent une expression précoce de l'ARNm de Piezo2 au niveau de la tête, comprenant les régions où se développent les vibrisses. Toutefois, il est souvent difficile d'étudier les cellules épidermiques avec cette technique lorsque la peau est bien kératinisée, car la kératine limite l'accès aux acides nucléiques dans le cytoplasme des cellules d'intérêts. Nos expériences suggèrent que le périderme, soit la dense couche de kératine retrouvée chez certains marsupiaux dont l'opossum, bloque le passage de la sonde Piezo2. En modifiant un protocole mis au point pour la souris (Wei et al., 2011), nous avons observé une expression de l'ARNm de Piezo2 au niveau du bouclier oral à la naissance. Deux observations rendent suspicieux les résultats obtenus à P0. D'une part, le marquage est très circonscrit par rapport à celui visible chez des souris d'âge comparable; il se limite au bouclier oral, sans s'étendre sur les joues ou le museau. D'autre part, même si la coloration obtenue résulte du traitement, car elle n'est pas observée chez les animaux non traités, la teinte est légèrement différente (moins bleutée) en comparaison de celle observée chez la souris. Le bouclier oral correspond à la région du museau qui fait contact avec la peau de la mère (Nelson, 1992; Schneider, 2011) ce qui rend possible le fait qu'une quantité plus ou moins importante de tissu épithélial maternel reste déposé à ce niveau lorsque les petits sont retirés de la mère. Comme l'épiderme se renouvelle par lyse des kératinocytes, il est possible que l'ARNm de Piezo2

provenant de l'épithélium maternel reste pris au niveau du bouclier oral et ne se dégrade pas ou moins rapidement que dans les régions directement exposées à l'air. Pour bien vérifier que l'ARNm de Piezo2 est exprimé à ce niveau, d'autres types d'expériences devraient être tentées. Par exemple, il serait intéressant de réaliser de l'hybridation sur lame, ce qui éliminerait d'emblée le problème de l'épaisseur de l'épiderme et permettrait une meilleure visualisation des tissus en cas de marquage. Par manque de matériel et d'expertise, ces avenues n'ont pas été poursuivies dans ce travail. Nous nous sommes plutôt tournés vers l'étude protéinique de Piezo2.

## **4.2 Peau faciale**

L'hypothèse principale que cette étude testait était que Piezo2 était un des canaux mécanosensibles impliqués dans la détection du toucher au niveau du museau de l'opossum nouveau-né. Les résultats que nous avons obtenus démentent cette hypothèse, car aucun marquage pour Piezo2 n'a été observé dans la peau, même chez l'adulte. Malgré une complexification importante du tégument, comprenant des structures qui sont innervées par des fibres exprimant Piezo2 chez la souris, nos observations suggèrent que Piezo2 n'est pas exprimé dans la peau faciale de l'opossum.

La plupart des études montrant que Piezo2 est impliqué dans la mécanotransduction au niveau des récepteurs peauciers ont été faites chez les mammifères euthériens (Ranade et al., 2014b; Zhang et al., 2019) ou chez d'autres vertébrés (Faucherre et al., 2013) à des stades assez matures. Peu d'études ont été réalisées sur le développement de Piezo2 (voir García-Mesa et al., 2022) et il n'en existe aucune, à notre connaissance, spécifiquement au niveau de la peau du visage ou des ganglions céphaliques.

D'autres récepteurs moléculaires doivent être envisagés pour expliquer les réponses sensorielles aux stimulations mécaniques du visage induites dès la naissance chez l'opossum (Desmarais et al., 2016). Toutefois, il n'existe pas encore d'autres mécanorécepteurs aussi bien caractérisés que les Piezos. La famille des TRP (*transient receptor potentiel*) pourrait contenir des candidats, car ces récepteurs multimodaux sont impliqués dans la perception de plusieurs types de sensations - changements de température, détection d'agents chimiques, changements osmotiques. À ce jour chez les mammifères, 33 canaux TRP répartis en 7 sous-familles ont été identifiés et une sensibilité aux stimulations mécaniques a été proposée pour 9 isoformes (voir tableau 1) (Clapham et al., 2005; Kang et al., 2010). Cependant, leur implication dans la mécanosensation chez les mammifères reste encore discutée, car de nombreux résultats contradictoires ont été rapportés et leur présence dans des cellules mécanosensibles est rarement démontrée (Christensen et Corey, 2007; Sharif-Naeini et al., 2008). La plupart joueraient un rôle modulateur de l'activité mécanosensorielle plutôt que d'être la source de la mécanosensation. Toutefois, certains sont de meilleurs candidats en ce sens, comme le canal TRPV4 qui est présent dans le ganglion du trijumeau et des cellules de Merkel autour des vibrisses du rat adulte (Liedtke et al., 2005). Il serait intéressant d'étudier si ce canal est présent chez l'opossum *Monodelphis domestica* nouveau-né. Des expériences en immunohistochimie ainsi que des expériences complémentaires sur préparations *in vitro* utilisant des substances pharmacologiques antagonistes telles que le carvacrol (Nazıroğlu, 2022) pourraient être réalisées afin d'apporter des éléments de réponses.

### 4.3 Système vestibulaire

L'hypothèse de départ était que Piezo2 serait présent dans la macule utriculaire à la naissance avant d'apparaître dans les autres organes vestibulaires. Nos résultats montrent que c'est effectivement le cas même si, sur la base de l'expression de Piezo2, la maturation respective des différents organes semble suivre un décours temporel presque similaire. En effet, on observe un assez faible marquage Piezo2 dans la macule utriculaire à la naissance, dont l'intensité augmente à P7 et se stabilise vers P14. Dans la macule sacculaire et les crêtes ampullaires, une faible expression de Piezo2 est observable à P7 suivi d'une expression plus forte à P14 (Fig. 26). Ces observations permettent de penser que les premiers stades de maturation des cellules ciliées de la macule utriculaire s'effectuent principalement durant les 2 premières semaines postnatales, alors que cette maturation s'effectue plus durant les 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> semaines postnatales dans les autres organes vestibulaires. Cela confirme d'autres études (Pflieger et Cabana, 1996; Ashwell et Shulruf, 2014) qui montrent que la macule utriculaire est un peu plus mature à la naissance chez les marsupiaux et qu'elle est suivie de la macule sacculaire et des crêtes ampullaires.

L'expression de Piezo2 prend la forme de disques tout comme l'actine qui précède l'apparition des faisceaux de stéréocils. Il est donc plausible que ce canal soit retrouvé au niveau de la surface apicale des cellules ciliées vestibulaires. Dans la macule utriculaire de l'opossum nouveau-né, l'expression de Piezo2 est comparativement faible par rapport à ce qui est observé à P7, ce qui suggère que cette macule n'est pas encore fonctionnelle. La macule sacculaire et les crêtes ampullaires montrant une maturation plus tardive, cela permet de penser que le système vestibulaire n'est pas assez mature pour jouer un rôle fonctionnel à la naissance chez l'opossum. Des stimulations vestibulaires sur des préparations *in vitro* d'opossums nouveau-nés n'induisent d'ailleurs pas de réponses motrices entre P0 et P12 (Adadja et al., 2013; Lanthier, 2017). Ce que

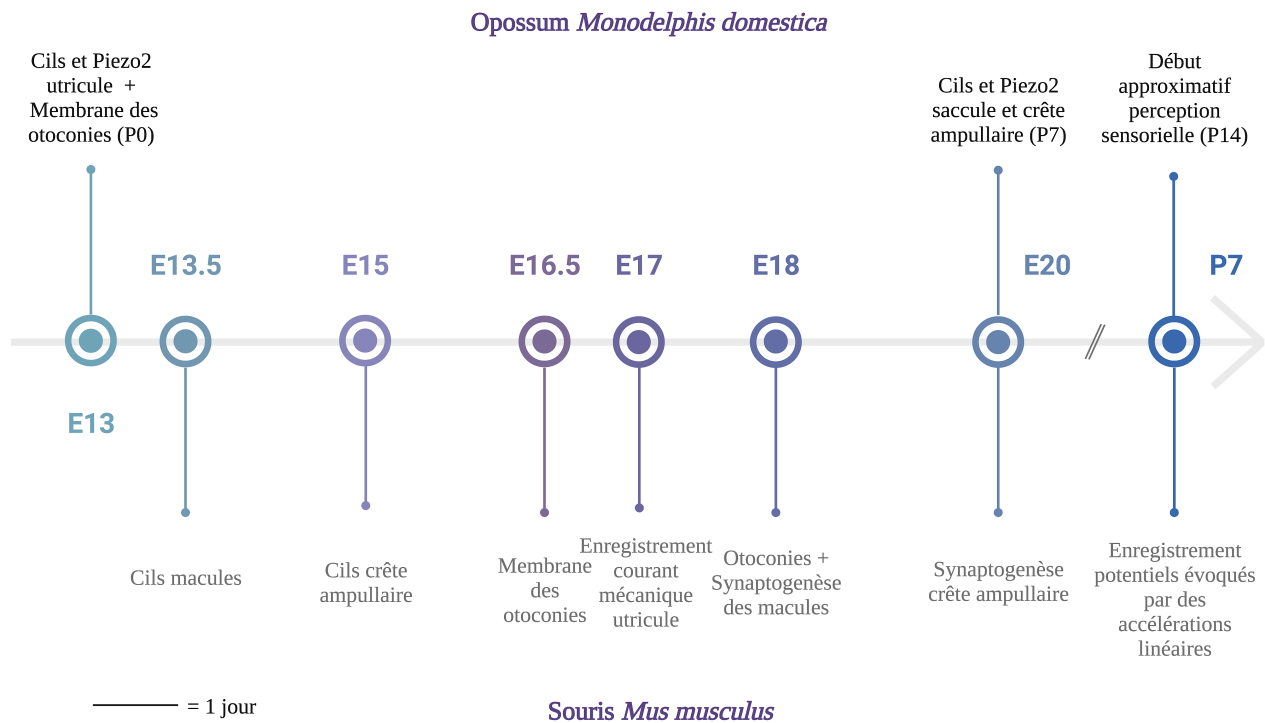


nous observons chez l'opossum est possiblement valable chez d'autres espèces marsupiales. En effet, une étude de comparaison anatomique (Ashwell et Shulruf, 2014) a montré que, à l'exception des Dasyuridés, qui naissent beaucoup plus immatures, de nombreuses espèces de marsupiaux naissent à des stades de maturation vestibulaire comparables à celui de l'opossum.

Nos résultats permettent seulement une approximation du développement fonctionnel des organes sensoriels, car si Piezo2 est associé à des courants précoces, ce sont des courants dits « inversés » et non les courants « normaux » associés aux cellules matures (Beurg et al., 2016; Kim et al., 2013). La présence des disques d'actine aux âges précoces est possiblement le signe que le cytosquelette à la surface apicale des cellules ciliées s'organise pour former l'ébauche des cils, mais la méthodologie utilisée ne permet pas d'observer les premiers stades de développement de ces structures. La présence de cils a été notée vers P7 au niveau des crêtes ampullaires, possiblement parce qu'ils sont plus longs dans ces organes, et P12 au niveau des macules. Chez le rat, une importante maturation fonctionnelle du système vestibulaire a lieu durant la première semaine postnatale (Lannou et al., 1979; Parrad et Cottureau, 1977) ce qui correspond approximativement à la deuxième semaine chez l'opossum. Si on assume un rythme de développement semblable du rat et de l'opossum, ce qui semble être le cas pour le système vestibulaire (Ashwell et Shulruf, 2014), P14 serait donc un âge minimal approximatif pour le début de la perception sensorielle dans ces organes. C'est d'ailleurs vers le début de la seconde semaine postnatale que les cellules ciliées des différents organes vestibulaires expriment fortement Piezo2 et semblent avoir développé des cils, mais leur maturation continue sans doute par après. Cela s'accorderait avec le développement de certains comportements, notamment de réflexes. En effet, chez l'opossum, le réflexe de redressement sur une surface - qui consiste pour l'animal à se replacer sur les pattes après avoir été posé dos contre une surface - montre une phase de maturation importante au cours de la 3<sup>e</sup> semaine

postnatale (Cassidy et al., 1994). Toutefois, pour s'en assurer, il serait intéressant d'enregistrer les réponses des cellules ciliées à la suite de stimulations des cils à partir de cet âge.

La présence de l'expression du canal ionique mécanosensible Piezo2 à des âges précoces chez l'opossum permet d'envisager l'étude de son rôle lors du développement. Il serait intéressant d'étudier le développement de Piezo2 en relation avec le substrat moléculaire responsable des courants « normaux ». Par exemple, en étudiant l'expression développementale du canal transmembranaire TMC1/2, une composante importante du complexe de transduction sensorielle des cellules ciliées vestibulaires matures (Pan et al., 2018). Le développement fonctionnel de ces cellules a été beaucoup moins étudié que leur physiologie chez l'adulte (voir par exemple, Kros et al., 1992; 1993; 1995; Ashmore et al. 1993).



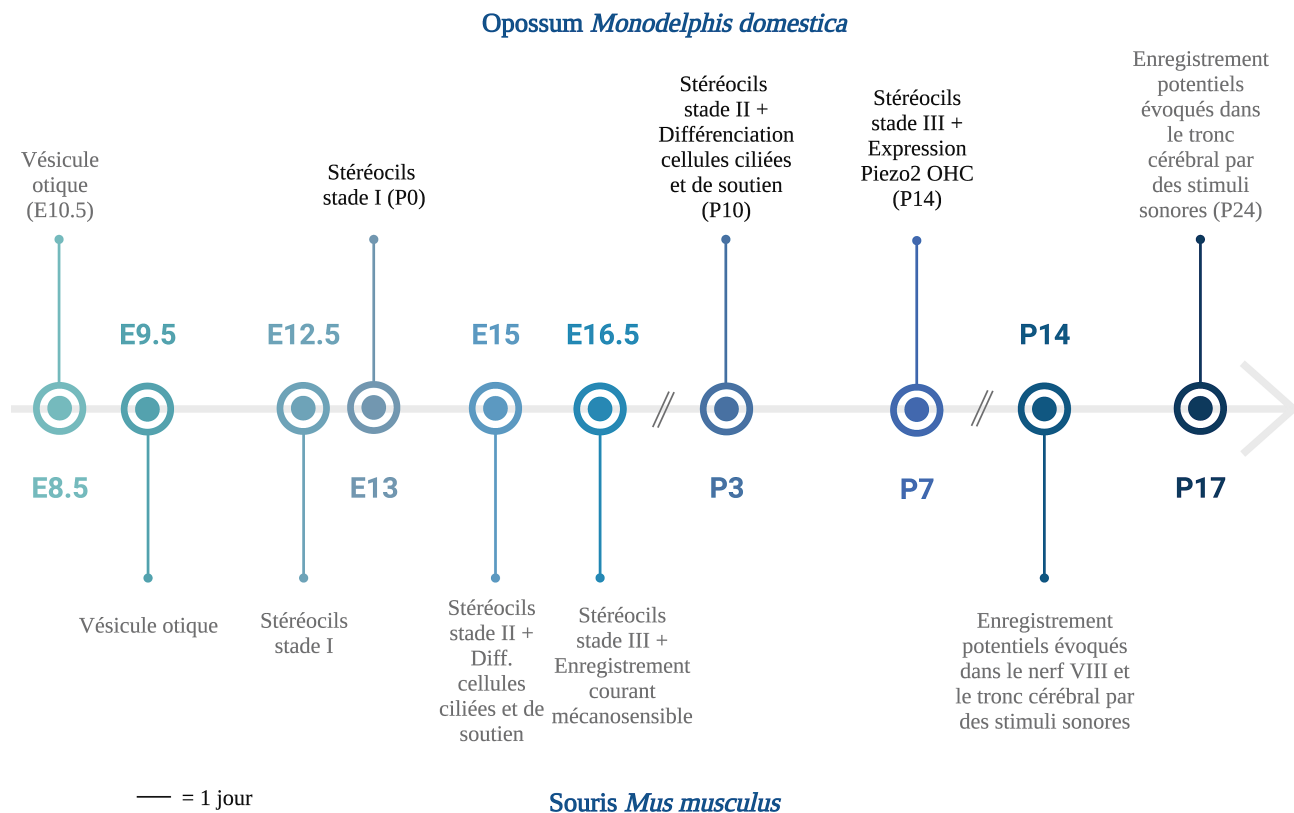
**Figure 26. Étapes du développement des cellules ciliées vestibulaires chez l’opossum (*Monodelphis domestica*) et la souris (*Mus musculus*).** L’échelle temporelle présente les âges en jours embryonnaires (E) et postnataux (P) où certaines étapes de développement se produisent chez la souris (en bas). Les âges auxquels se produisent ces étapes sont donnés entre parenthèses chez l’opossum (en haut) et sont rapportés à des âges comparables chez la souris. Le texte en gris correspond à ce qui a été rapporté dans la littérature (Denman-Johnson et Forge, 1999; Geleoc et Holt, 2003; Mbiene et Sans, 1986) et celui en noir à ce qui a été observé dans la présente thèse. Barre d’échelle, 1 jour.

## 4.4 Système cochléaire

Les expériences réalisées dans le cadre de cette section testaient l'hypothèse que les cellules ciliées cochléaires montraient du marquage Piezo2 peu après la naissance chez l'opossum puisque, chez la souris, elles expriment Piezo2 dès E16.5 (Johnson et al., 2005; Wu et al., 2017). Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'il y a effectivement du marquage Piezo2 au niveau de l'organe de Corti à la naissance, mais qu'il concerne toutes les cellules de l'épithélium et pas seulement les cellules ciliées présomptives. Avec le temps, le marquage se restreint de plus en plus aux cellules ciliées jusqu'à P14, où le marquage sous forme de disques d'un diamètre cellulaire permet de penser à une expression au seul niveau des cellules ciliées.

Afin d'observer la relation entre l'expression de Piezo2 et les cellules ciliées, nous avons tenté de marquer spécifiquement ces dernières en immunohistochimie. Cependant, les différents anticorps dirigés contre *Atoh1*, contre la myosine VI (MYO6) et contre l'otoferlin (voir tableau 4) n'ont pas permis de marquer ces cellules chez l'opossum. Nous nous sommes donc tournés vers la phalloïdine, même si elle est moins spécifique, car elle marque l'actine, soit un élément du cytosquelette de la majorité des cellules de l'organisme. La grande quantité d'actine présente dans les cils fait que les cellules ciliées peuvent être identifiées à P14 par la configuration en forme de V des trois rangées de cellules ciliées externes et en forme transversale plus ou moins linéaire de la rangée de cellules ciliées internes (Waguespack et al., 2007). La morphologie particulière des disques où se développent les cils supporte l'idée que les disques similaires observés lors du marquage Piezo2 se trouvent bien au niveau des OHC à P14.

À des stades plus précoces, nos observations en microscopie photonique ne permettent que des comparaisons superficielles avec le développement des stéréocils chez la souris. Le développement des faisceaux de stéréocils de l'opossum semble plus tardif que celui de la souris. En effet, les stéréocils de souris au stade II sont déjà répartis en faisceaux isolés les uns des autres sur des cellules ciliées différenciées vers E15, ce qui correspond au 2<sup>e</sup> jour postnatal chez l'opossum. À ce stade, le marquage de la phalloïdine et celui de Piezo2 sont sous la forme d'une ligne continue au niveau de la région ventrale de l'épithélium cochléaire immature, suggérant que les cellules ciliées sous-jacentes n'ont pas terminé leur différenciation et que nous sommes en présence du premier stade de croissance des stéréocils. L'opossum paraît atteindre le stade II plusieurs jours plus tard, soit vers P9 avec l'observation d'une rangée de cellules ciliées internes marquées avec la phalloïdine. À ce stade, les cellules ciliées externes ne peuvent toujours pas être distinguées de l'ensemble des cellules épithéliales de la région externe. Elles deviennent identifiables autour de E15 à E16 chez la souris (Chacon-Heszele et al., 2012; McKenzie et al., 2004) et de P10 à P11 chez l'opossum, soit à mesure que le marquage circonférentiel à la phalloïdine devient plus net (voir Figure 27). Ces résultats suggèrent que la différenciation des cellules ciliées internes précède légèrement celle des cellules ciliées externes chez l'opossum comme chez la souris (Huh et al., 2012).



**Figure 27. Étapes du développement des cellules ciliées cochléaires chez l’opossum (*Monodelphis domestica*) et la souris (*Mus musculus*).** L’échelle temporelle présente les âges en jours embryonnaires (E) et postnataux (P) où certaines étapes de développement se produisent chez la souris (en bas). Les âges auxquels se produisent ces étapes sont donnés entre parenthèses chez l’opossum (en haut) et sont rapportés à des âges comparables chez la souris. Le texte en gris correspond à ce qui a été rapporté dans la littérature (Basch et al., 2016; Huh et al., 2012; Kelley, 2007; Marcotti et al., 2003) et celui en noir à ce qui a été observé dans la présente thèse. Barre d’échelle, 1 jour.

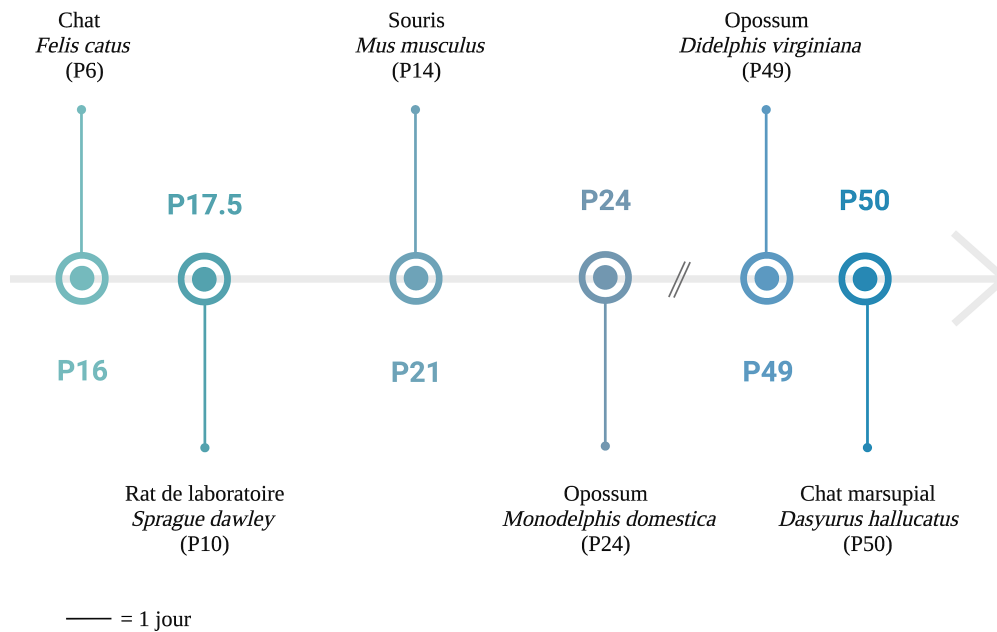
Le développement fonctionnel des cellules ciliées peut également être relié à la protéine Piezo2. Le courant induit par la mécanotransduction de Piezo2 est inversé (voir section 1.4.3) (Michalski et al., 2007; Shotwell et al., 1981). Ces canaux localisés sur la surface apicale des cellules ciliées, à la base des stéréocils, sont activés par des déformations de la membrane cellulaire en fonction de la déflexion des stéréocils dans la direction inverse, soit vers le stéréocil le plus court. Ces courants sont encore peu étudiés et leur rôle est encore méconnu. Le fait qu'ils soient fonctionnels précocement a conduit certains auteurs à proposer qu'ils jouent un rôle dans la maturation des cellules ciliées (Beurg et Fettiplace, 2017). En utilisant la souris comme modèle, des chercheurs ont confirmé que l'intensité des courants de polarité inversée est importante vers E16.5 et s'annule vers P4 (Beurg et al., 2016; Johnson et al., 2005; Kim et al., 2013), ce qui correspond approximativement à un intervalle d'âges entre P3 à P11 chez l'opossum (voir tableau 2). Dans le même laps de temps, les courants normaux se développent et ce sont eux qui prédominent fonctionnellement chez l'adulte. L'expression précoce de Piezo2 que nous observons chez l'opossum à P0 indique un mécanisme physiologique favorisant la maturation fonctionnelle des cellules ciliées, par exemple, les déformations de la surface apicale pourraient favoriser des courants ayant pour conséquence d'induire et de soutenir la croissance des cils. Toutefois, cette hypothèse demanderait à être testée, car les IHC développent des cils, mais n'expriment que rarement Piezo2 tôt dans le développement chez la souris (Wu et al., 2017) et n'exprime pas encore Piezo2 à P14 chez l'opossum.

C'est seulement vers le début de la seconde semaine postnatale que les cellules ciliées externes différenciées expriment fortement Piezo2, elles ont alors acquis des cils. Le rôle principal des OHC est de capter les oscillations de la membrane basilaire et d'amplifier la stimulation des IHC en régulant entre autres les mouvements de la membrane tectoriale (Ashmore, 2008; Dallos, 2008;

Meyer et Moser, 2010). P14 serait donc un âge minimal approximatif pour le début du fonctionnement des OHC. Toutefois, l'oreille est encore trop immature pour permettre l'audition. En effet, les osselets sont encore peu développés dans l'oreille moyenne à cet âge (Sánchez-Villagra et al., 2002). Ce n'est que vers P24 que l'activité auditive est suffisante pour provoquer des potentiels auditifs évoqués dans le tronc cérébral (Reimer, 1995) et le colliculus inférieur (Aitkin et al., 1997), et le méat auditif externe ne s'ouvre que vers la 5<sup>e</sup> semaine postnatale (Cassidy et al., 1994). L'expression précoce de Piezo2 suggère que la maturation fonctionnelle des OHC pourrait précéder celle des IHC de plusieurs jours, voire semaines. D'autres études seront nécessaires afin de déterminer si le développement des OHC influence celui des IHC et à quel moment ces dernières commencent à transmettre les informations auditives perçues au SNC.

Le développement fonctionnel cochléaire de l'opossum *Monodelphis domestica* semble généralement plus rapide que chez d'autres espèces marsupiales, considérant que des potentiels évoqués ne peuvent être enregistrés qu'à partir de P49 chez l'opossum *Didelphis virginiana* (McCrary, 1938) et vers P45-50 chez le chat marsupial *Dasyurus hallucatus* (Aitkin et al., 1994). Il est cependant plus tardif que chez les placentaires puisque des chercheurs ont noté une sensibilité au son à partir de 6 jours postnataux chez le chat *Felis catus* (Aitkin et Moore, 1975; Foss et Flottorp, 1974), entre les jours 10 et 12 chez le rat de laboratoire *Sprague dawley* (Ehret, 1983; Pysh, 1969), à partir de 14 jours chez la souris *Mus musculus* (Ehret, 1976a) et vers 32 jours chez le furet *Mustela putorius* (Brunso-Bechtold et al., 1992; Moore, 1982). Ces données sont comparées à la Figure 28.





**Figure 28. Début de la sensibilité au son chez différentes espèces de mammifères.** L'échelle temporelle présente les âges en jours postnataux (P) approximatifs où le système auditif devient fonctionnel chez des euthériens (Butler et Juurlink, 1987; Evans et Sack, 1973) et des marsupiaux (Aitkin et al., 1994, 1997; McCrady, 1938). Les âges auxquels se produisent les mêmes étapes sont donnés entre parenthèses chez les différentes espèces et sont rapportés à des âges comparables chez l'opossum *Monodelphis domestica*. Barre d'échelle, 1 jour.

La membrane tectoriale qui recouvre l'organe de Corti présentait également du marquage Piezo2 dès P14. Présente dans l'oreille interne des reptiles, des oiseaux et des mammifères (Goodyear et Richardson, 2002; Teudt et Richter, 2014), cette matrice extracellulaire joue un rôle modulateur de l'audition en influençant l'activité des OHC qui, indirectement, influencent celle des IHC. La matrice contient un grand nombre de molécules, dont la bêta-tectorine (TECTB), l'alpha-tectorine (TECTA), l'otogelin, l'otogelin-like et la molécule d'adhésion CEACAM16 (Cohen-Salmon et al., 1997; Legan et al., 2014, 1997; Legan et Richardson, 1997; Yariz et al., 2012; Zheng et al., 2011). Toutefois, la présence de Piezo2 dans la membrane tectoriale n'a pas été rapportée chez d'autres espèces à notre connaissance. Il est possible que ça soit dû au fait que chez d'autres espèces, principalement la souris, les expériences visent l'expression génique (hybridation *in situ*, animaux transgéniques exprimant un marqueur fluorescent dans les cellules exprimant l'ARNm de Piezo2), alors que notre utilisation de l'immunohistochimie vise la protéine. Le rôle que pourrait jouer une protéine considérée comme membranaire dans une matrice extracellulaire est difficile à expliquer. Il est possible que la protéine Piezo2 affecte les propriétés physiques de la matrice de la membrane tectoriale de manière à favoriser son rôle fonctionnel.

Nous avons aussi observé du marquage Piezo2 dans les membranes otolithiques des deux macules, mais pas dans les cupules des crêtes ampullaires. Cela suggère que la synthèse des cupules suit des mécanismes différents de ceux des membranes tectoriales et otolithiques. Afin de vérifier cette idée, des expériences complémentaires seraient nécessaires, à commencer par déterminer si Piezo2 est présent dans ces membranes chez d'autres espèces.

## Conclusion générale

*Hâtez-vous lentement, et, sans perdre courage  
Vingt fois sur le métier remettez votre ouvrage  
Polissez-le sans cesse et le repolissez  
Ajouter quelquefois, et souvent effacez<sup>5</sup>*

– Nicolas Boileau (1636 – 1711), homme de lettres

Les expériences effectuées dans le cadre de cette thèse ont contribué à mieux comprendre le développement précoce des sens haptique, vestibulaire et cochléaire de l’opossum. Contrairement à ce qui est observé chez d’autres mammifères, Piezo2 ne semble pas être une composante majeure de la mécanosensibilité des récepteurs peauciers chez l’opossum. Dans le système vestibulaire, la présence de Piezo2 dans la macule utriculaire uniquement confirme qu’elle se développe un peu plus précocement que les autres organes sensoriels vestibulaires. Toutefois, l’expression de Piezo2 dans cette macule est comparativement trop faible à la naissance pour être fonctionnelle, infirmant l’hypothèse que le système vestibulaire joue un rôle dans le contrôle sensorimoteur lors de la naissance chez l’opossum. Ce canal membranaire est cependant lié à la maturation des cellules ciliées de l’oreille interne. Son expression par les cellules ciliées cochléaires suggère qu’elles

---

<sup>5</sup> Boileau, 1718.

subissent d'importantes modifications fonctionnelles durant la 2<sup>e</sup> semaine postnatale, c'est-à-dire à des âges correspondant à ce qui est observé chez les euthériens. Piezo2 semble aussi jouer un rôle dans le développement de la membrane tectoriale de l'organe de Corti et les membranes otolithiques des macules, mais d'autres études sont nécessaires pour comprendre celui-ci. Cette étude ouvre ainsi de nouvelles avenues de recherche sur le développement de la perception mécanosensorielle chez l'opossum, dans des perspectives adaptatives et comparatives.



**Figure 29.** Opossum *Monodelphis domestica*. Crédit photo Dr. Jean-François Pflieger

## Références bibliographiques

- Abraira VE, Ginty DD (2013) The sensory neurons of touch. *Neuron*, 79(4), 618–639.
- Adadja T, Cabana T, Pflieger JF (2013) Cephalic sensory influence on forelimb movement in newborn opossums, *Monodelphis domestica*. *Neuroscience*, 228, 259-270.
- Aitkin LM, Moore DR (1975) Inferior colliculus II. Development of tuning characteristics and tonotopic organization in central nucleus of the neonatal cat. *Journal of Neurophysiology*, 38(5), 1208-1216.
- Aitkin L, Nelson J, Farrington M, Swann S (1991) Neurogenesis in the brain auditory pathway of a marsupial, the Northern native cat (*Dasyurus hallucatus*). *Journal of Comparative Neurology*, 309(2), 250-260.
- Aitkin L, Nelson J, Farrington M, Swann S (1994) The morphological development of the inferior colliculus in a marsupial, the Northern quoll (*Dasyurus hallucatus*). *The Journal of Comparative Neurology*, 343(4), 532-541.
- Aitkin L, Cochran S, Frost S, Martsi-McClintock A, Masterton B (1997) Features of the auditory development of the short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*: evoked responses, neonatal vocalizations and synapses in the inferior colliculus. *Hearing Research*, 113(1-2), 69–73.
- Alagramam KN, Goodyear RJ, Geng R, Furness DN, van Aken AFJ, Marcotti W, Kros CJ, Richardson GP (2011) Mutations in protocadherin 15 and cadherin 23 affect tip links and mechanotransduction in mammalian sensory hair cells. *PLoS One*, 6(4), e19183.
- Al-Ghoul WM, Miller MW (1993) Development of the principal sensory nucleus of the trigeminal nerve and evidence for a transient synaptic field in the trigeminal tract. *The Journal of Comparative Neurology*, 330(4), 476-490.
- Alsina B, Whitfield TT (2017) Sculpting the labyrinth: Morphogenesis of the developing inner ear. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 65, 47-59.

Altman J, Bayer SA (1980a) Development of the brain stem in the rat. I. Thymidine radiographic study of the time of origin of neurons of the lower medulla. *Journal of Comparative Neurology*, 194(1), 1–35.

Altman J, Bayer SA (1980b) Development of the brain-stem in the rat. II. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons of the upper medulla, excluding the vestibular and auditory nuclei. *Journal of Comparative Neurology*, 194(1), 37–56.

Altman J, Bayer SA (1980c) Development of the brain stem in the rat. IV. Thymidine- radiographic study of the time of origin of neurons in the pontine region. *The Journal of Comparative Neurology*, 194(4), 905–929.

Al-Moyed H, Cepeda AP, Jung S, Moser T, Kügler S, Reisinger E (2019) A dual-avv approach restores fast exocytosis and partially rescues auditory function in deaf otoferlin knock-out mice. *EMBO Molecular Medicine*, 11(1), e9396.

Angelaki DE, Cullen KE (2008) Vestibular system: the many facets of a multimodal sense. *Annual Review of Neuroscience*, 31, 125-150.

Anderson EO, Schneider ER, Bagriantsev SN (2017) Piezo2 in cutaneous and proprioceptive mechanotransduction in vertebrates. *Current Topics in Membranes*, 79, 197-217.

Andolfo I, Alper SL, De Franceschi L, Auriemma C, Russo R, De Falco L, Vallefucio F, Esposito MR, Vidorpe DH, Shmukler BE et al. (2013) Multiple clinical forms of dehydrated hereditary stomatocytosis arise from mutations in Piezo1. *Blood*, 121(19), 3925–3935.

Anniko M (1980) Development of otoconia. *American Journal of Otolaryngology*, 1(5), 400–410.

Arnadóttir J, O’Hagan R, Chen Y, Goodman MB, Chalfie M (2011) The DEG/ ENaC protein MEC-10 regulates the transduction channel complex in *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *The Journal of Neuroscience*, 31(35), 12695–704.

Ashmore JF, Kolston PJ, Mammano F (1993) Dissecting components of the outer hair cell feedback loop. In: *Biophysics of hair cell sensory systems* (ed. Duifhuis H, Horst JW, van Dijk P et van Netten SM), pp. 151–158. Singapore: World Scientific.

Ashmore J (2008) Cochlear outer hair cell motility. *Physiological Reviews*, 88, 173–210.

Ashwell KWS (2015) Timing of mammalian peripheral trigeminal system development relative to body size: A comparison of metatherians with rodents and monotremes. *Somatosensory and Motor Research*, 32(3), 187–199.

Ashwell KW, Shulruf B (2014) Vestibular development in marsupials and monotremes. *Journal of Anatomy*, 224(4), 447–458.

Ashwell KWS, Hardman CD, Paxinos G (2006) Cyto- and chemoarchitecture of the sensory trigeminal nuclei of the echidna, platypus and rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 3(2), 81–107.

Atkinson PJ, Huarcaya Najarro E, Sayyid ZN, Cheng AG (2015) Sensory hair cell development and regeneration: similarities and differences. *Development*, 142(9), 1561-1571.

Avenarius MR, Saylor KW, Lundeberg MR, Wilmarth PA, Shin JB, Spinelli KJ, Pagana JM, Andrade L, Kachar B, Choi D, David LL, Barr-Gillespie PG (2014) Correlation of actin crosslinker and capper expression levels with stereocilia growth phases. *Molecular and Cellular Proteomics*, 13(2), 606–620.

Baggott LM, Davis-Butler S, Moore HD (1987) Characterization of oestrus and timed collection of oocytes in the grey short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 79(1), 105–114.

Barmack NH (2003) Central vestibular system: vestibular nuclei and posterior cerebellum. *Brain Research Bulletin*, 60(5-6), 511-541.

Barr-Gillespie PG (2015) Assembly of hair bundles, an amazing problem for cell biology. *Molecular Biology of the Cell*, 26(15), 2727–2732.



Barthélemy D, Cabana T (2005) Postnatal development of limb motor innervation in the opossum *Monodelphis domestica*: immunohistochemical localization of acetylcholine. *Developmental Brain Research*, 155(2), 87–98.

Basch ML, Beown RM, Jen HI, Groves AK (2016) Where hearing starts: the development of the mammalian cochlea. *Journal of Anatomy*, 228(2), 233-254.

Bermingham NA, Hassan BA, Price SD, Vollrath MA, Ben-Arie N, Eatock RA, Bellen HJ, Lysakowski A, Zoghbi HY (1999) Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science*, 284(5421), 1837–1841.

Berrout J, Jin M, O’Neil RG (2012) Critical role of TRPP2 and TRPC1 channels in stretch-induced injury of blood–brain barrier endothelial cells. *Brain Research*, 1436, 1–12.

Beurg M, Evans MG, Hackney CM, Fettiplace R (2006) A large-conductance calcium-selective mechanotransducer channel in mammalian cochlear hair cells. *The Journal of Neuroscience*, 26(43), 10992–11000.

Beurg M, Goldring AC, Ricci AJ, Fettiplace R (2016) Development and localization of reverse-polarity mechanotransducer channels in cochlear hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(24), 6767–6772.

Beurg M, Fettiplace R (2017) Piezo2 as the anomalous mechanotransducer channel in auditory hair cell. *The Journal of Physiology*, 595(23), 7039-7048.

Beurg M, Cui R, Goldring AC, Ebrahim S, Fettiplace R, Kachar B (2018) Variable number of TMC1-dependent mechanotransducer channels underlie tonotopic conductance gradients in the cochlea. *Nature Communication*, 9(1), 2185.

Beyder A, Rae JL, Bernard C, Strege PR, Sachs F, Farrugia G (2010) Mechanosensitivity of Nav1.5, a voltage-sensitive sodium channel. *The Journal of Physiology*, 588(Pt 24), 4969–85.

Blount P, Sukharev SI, Moe PC, Martinac B, Kung C (1999) Mechanosensitive channels of bacteria. *Methods in Enzymology*, 294, 458–82.

Boileau N (1718) Œuvres de Nicolas Boileau Despréaux. Hachette livre.

- Bok J, Zenczak C, Hwang CH, Wu DK (2013) Auditory ganglion source of Sonic hedgehog regulates timing of cell cycle exit and differentiation of mammalian cochlear hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110(34), 13 869–13 874.
- Brierley SM, Castro J, Harrington AM, Hughes PA, Page AJ, Rychkov G, Blackshaw LA (2011) TRPA1 contributes to specific mechanically activated currents and sensory neuron mechanical hypersensitivity. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 14), 3575–93.
- Brunso-Bechtold JK, Henkel CK, Linville C (1992) Ultrastructural development of the medial superior olive (MSO) in the ferret. *The Journal of Comparative Neurology*, 324(4), 539-556.
- Brohawn SG, del Marmol J, MacKinnon R (2012) Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K<sup>+</sup> ion channel. *Science*, 335(6067), 436–41.
- Bryant J, Goodyear RJ, Richardson GP (2002) Sensory organ development in the inner ear: molecular and cellular mechanisms. *British Medical Bulletin*, 63, 39–57.
- Bulankina AV, Moser T (2012) Neural circuit development in the mammalian cochlea. *Physiology (Bethesda)*, 27(2), 100–112.
- Burns JC, Stone JS (2017) Development and regeneration of vestibular hair cells in mammals. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 65, 96-105.
- Butler H, Juurlink BHJ (1987) *An atlas for staging mammalian and chick embryos*. Boca Raton, Floride, CRC Press; p. 218.
- Cabana T (2000) The development of mammalian motor systems: The opossum *Monodelphis domestica* as a model. *Brain Research Bulletin*, 53(5), 615–626.
- Cahalan SM, Lukacs V, Ranade SS, Chien S, Bandell M, Patapoutian A (2015) Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume. *eLife*, 4, e07370.
- Cai T, Seymour ML, Zhang H, Pereira FA, Groves AK (2013) Conditional deletion of Atoh1 reveals distinct critical periods for survival and function of hair cells in the organ of Corti. *The Journal of Neuroscience*, 33(24), 10110–10122.

Calabrese B, Tabarean IV, Juranka P, Morris CE (2002) Mechanosensitivity of N-type calcium channel currents. *Biophysical Journal*, 83(5), 2560–74.

Cannon JR, Bakker HR, Bradshaw SD, McDonald IR (1976) Gravity as the sole navigational aid to the newborn quokka. *Nature*, 259, 42.

Capra NF, Dessem D (1992) Central connections of trigeminal primary afferent neurons: topographical and functional considerations. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 4(1), 1–52.

Cassidy G, Boudrias D, Pflieger JF, Cabana T (1994) The development of sensorimotor reflexes in the Brazilian opossum *Monodelphis domestica*. *Brain, Behavior and Evolution*, 43(4–5), 244–53.

Cazin L, Magnin M, Lannou J (1982) Non-cerebellar visual afferents to the vestibular nuclei involving the prepositus hypoglossal complex: an autoradiographic study in the rat. *Experimental Brain Research*, 48(2), 309–313.

Chacon-Heszele MF, Ren D, Reynolds AB, Chi F, Chen P (2012) Regulation of cochlear convergent extension by the vertebrate planar cell polarity pathway is dependent on p120-catenin. *Development*, 139(5), 968–978.

Chalfie M (2009) Neurosensory mechanotransduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1), 44–52.

Chen P, Johnson JE, Zoghbi HY, Segil N (2002) The role of Math1 in inner ear development: uncoupling the establishment of the sensory primordium from hair cell fate determination. *Development*, 129(10), 2495–2505.

Christensen AP, Corey DP (2007) TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nature Reviews Neuroscience*, 8(7), 510–521.

Cinar E, Zhou S, DeCoursey J, Wang Y, Waugh RE, Wan J (2015) Piezo1 regulates mechanotransductive release of ATP from human RBCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(38), 11783–11788.

Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G (2005) Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 427–450.

Clancy B, Kersh B, Hyde J, Darlington RB, Anand KJS, Finlay BL (2007) Web-based method for translating neurodevelopment from laboratory species to humans. *Neuroinformatics*, 5(1), 79-94.

Cohen YE, Knudsen EI (1999) Maps versus clusters: different representations of auditory space in the midbrain and forebrain. *Trends in Neuroscience*, 22(3), 97–142.

Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Leibovici M, Petit C (1997) Otogelin: A glycoprotein specific to the acellular membranes of the inner ear. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), 14450–14455.

Corey DP, Hudspeth AJ (1979) Ionic basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell. *Nature*, 281(5733), 675–677.

Corey DP, Hudspeth AJ (1983) Kinetics of the receptor current in bullfrog saccular hair cells. *The Journal of Neuroscience*, 3(5), 962–976.

Corey DP, Holt JR (2016) Are TMCs the mechanotransduction channels of vertebrate hair cells? *The Journal of Neuroscience*, 36(43), 10921-10926.

Corriveau-Parenteau E, Beauvais A, Angers A, Pflieger JF (2019) Influence of temperature on motor behaviors in newborn opossums (*Monodelphis domestica*): An *in vitro* study. *eNeuro*, 6(3), 1-18.

Costa A, Powell LM, Lowell S, Jarman AP (2017) Atoh1 in sensory hair cell development: constraints and cofactors. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 65, 60-68.

Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically-activated cation channels. *Science*, 330(6000), 55-60.

Coste B, Xiao B, Santos JS, Syeda R, Grandl J, Spencer KS, Kim SE, Schmidt M, Mathur J, Dubin AE, Montal M, Patapoutian A (2012) Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature*, 483(7388), 176–181.

Coste B, Murthy SE, Mathur J, Schmidt M, Mechioukhi Y, Delmas P, Patapoutian A (2015) Piezo1 ion channel pore properties are dictated by C-terminal region. *Nature Communications*, 6, 7223.

Cotanche DA, Corwin JT (1991) Stereociliary bundles reorient during hair cell development and regeneration in the chick cochlea. *Hearing Research*, 52(2), 379–402.

Couloigner V, Teixeira M, Sterkers O, Ferrary E (1999) In vivo study of the electrochemical composition of luminal fluid in the guinea pig endolymphatic sac. *Acta Oto-Laryngologica*, 119, 200-202.

Cox CD, Bae C, Ziegler L, Hartley S, Nikolova-Krstevski V, Rohde PR, Ng CA, Sachs F, Gottlieb PA, Martinac B (2016) Removal of the mechanoprotective influence of the cytoskeleton reveals PIEZO1 is gated by bilayer tension. *Nature Communications*, 7, 10366.

Crick F (1988). *What mad pursuit: A personal view of scientific discovery*. Basic Books.

Curthoys IS (1979) The development of function of horizontal semi-circular canal primary neurons in the rat. *Brain Research*, 167(1), 41-52.

Curthoys IS (1982) Postnatal developmental changes in the response of rat primary horizontal semicircular neurons to sinusoidal angular accelerations. *Experimental Brain Research*, 47(2), 295-300.

Dallos P (2008) Cochlear amplification, outer hair cells and prestin. *Current Opinion in Neurobiology*, 18(4), 370–376.

Dallos P, Wu X, Cheatham MA, Gao J, Zheng J, Anderson CT, Jia S, Wang X, Cheng WH, Sengupta S, He DZ, Zuo J (2008) Prestin-based outer hair cell motility is necessary for mammalian cochlear amplification. *Neuron*, 58(3), 333–339.

- Davidson P, Hardy MH (1952) The development of mouse vibrissae in vivo and in vitro. *Journal of Anatomy*, 86(4), 342–356.
- Delmas P, Hao J, Rodat-Despoix L (2011) Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(3), 139–153.
- Denk W, Holt JR, Shepherd GM, Corey DP (1995) Calcium imaging of single stereocilia in hair cells: localization of transduction channels at both ends of tip links. *Neuron*, 15(6), 1311–1321.
- Denman-Johnson K, Forge A (1999) Establishment of hair bundle polarity and orientation in the developing vestibular system of the mouse. *Journal of Neurocytology*, 28(10-11), 821–835.
- De Ridder D, Ryu H, Moller AR, Nowe V, Van de Heyning P, Verlooy J (2004) Functional anatomy of the human cochlear nerve and its role in microvascular decompressions for tinnitus. *Neurosurgery*, 54(2), 381–390.
- Desai SS, Ali H, Lysakowski A (2005a) Comparative morphology of rodent vestibular periphery. I. Sacculus and utricular maculae. *Journal of Neurophysiology*, 93(1), 251–266.
- Desai SS, Ali H, Lysakowski A (2005b) Comparative morphology of rodent vestibular periphery. II. Cristae ampullares. *Journal of Neurophysiology*, 93(1), 267–280.
- Desmadryl G, Raymond J, Sans A (1986) In vitro electrophysiological study of spontaneous activity in neonatal mouse vestibular ganglion neurons during development. *Developmental Brain Research*, 390(1), 133-136.
- Desmarais MJ, Beauregard F, Cabana T, Pflieger JF (2016) Facial Mechanosensory Influence on Forelimb Movement in Newborn Opossums, *Monodelphis domestica*. *Plos One*, 11(2), 1-15.
- Diamond J, Mills LR, Mearow KM (1988) Evidence that the Merkel cell is not the transducer in the mechanosensory Merkel cell–neurite complex. *Progress in Brain Research*, 74, 51-56.
- Doetzlhofer A, White P, Lee YS, Groves A, Segil N (2006) Prospective identification and purification of hair cell and supporting cell progenitors from the embryonic cochlea. *Brain Research*, 1091(1), 282– 288.

Driver EC, Sillers L, Coate TM, Rose MF, Kelley MW (2013) The Atoh1-lineage gives rise to hair cells and supporting cells within the mammalian cochlea. *Developmental Biology*, 376(1), 86–98.

Dror AA, Avraham KB (2009) Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annual Review of Genetics*, 43, 411–437.

Dumont RA, Zhao YD, Holt JR, Bahler M, Gillespie PG (2002) Myosin-I isozymes in neonatal rodent auditory and vestibular epithelia. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 3(4), 375–389.

Duncker SV, Franz C, Kuhn S, Schulte U, Campanelli D, Brandt N, Hirt B, Fakler B, Blin N, Ruth P, Engel J, Marcotti W, Zimmermann U, Knipper M (2013) Otoferlin couples to clathrin-mediated endocytosis in mature cochlear inner hair cells. *The Journal of Neuroscience*, 33(22), 9508–9519.

Ehret G (1983) Development of hearing and response behavior to sound stimuli: behavioral studies. In: R. Romand (Ed.) *Development of Auditory and Vestibular Systems*. Academic Press, New York, pp. 211-237.

Ehret G (1977) Postnatal development in the acoustic system of the house mouse in the light of developing masked thresholds. *Journal of the Acoustical Society of America*, 62(1), 143-148.

Ehret G (1976a) Development of absolute auditory thresholds in the house mouse (*Mus musculus*). *Journal of the American Audiology Society*, 1(5), 179–184.

Ehret G (1976b) Critical bands and filter characteristics in the ear of the house mouse (*Mus musculus*). *Biological Cybernetics*, 24(1), 35-42.

Ehret G (1975) Masked auditory thresholds, critical ratios, and scales of the basilar membrane of the house mouse (*Mus musculus*). *Journal of Comparative Physiology*, 103, 329-341.

Einstein A (1955, 5 mai) Old man's advice to youth: never lose a Holy curiosity. *Life Magazine*.

Erzurumlu RS, Jhaveri S (1992) Trigeminal ganglion cell processes are spatially ordered prior to the differentiation of the vibrissa pad. *The Journal of Neuroscience*, 12(10), 3946–3955.

Erzurumlu RS, Killackey HP (1983) Development of order in the rat trigeminal system. *Journal of Comparative Neurology*, 213(4), 365–380.

Estes JE, Selden LA, Gershman LC (1981) Mechanism of action of phalloidin on the polymerization of muscle actin. *Biochemistry*, 20, 708–712.

Evans HE, Sack WO (1973) Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C*, 2(1), 11–45.

Fadem BH, Trupin GL, VandeBerg JL, Hayssen V (1982) Care and Breeding of the Gray, Short-Tailed Opossum (*Monodelphis domestica*). *Laboratory Animal Science*, 32(4), 405–409.

Fang XZ, Zhou T, Xu JQ, Wang YX, Sun MM, He YJ, Pan SW, Xiong W, Peng ZK, Gao XH, Shang Y (2021) Structure, kinetic properties and biological function of mechanosensitive Piezo channels. *Cell and Bioscience*, 11(1), 1-20.

Faucherre A, Nargeot J, Mangoni ME, Jopling C (2013) Piezo2b regulates vertebrate light touch response. *The Journal of Neuroscience*, 33(43), 17089–94.

Faucherre A, Kissa K, Nargeot J, Mangoni ME, Jopling C (2014) Piezo1 plays a role in erythrocyte volume homeostasis. *Haematologica*, 99(1), 70–75.

Feito J, García-Suárez O, García-Piqueras J, García-Mesa Y, Pérez-Sánchez A, Suazo I, Cabo R, Suárez-Quintanilla J, Cobo J, Vega JA (2018) The development of human digital Meissner's and Pacinian corpuscles. *Annals of Anatomy*, 219, 8–24.

Feldman AG, Orlovsky GN (1972) The influence of different descending systems on the tonic stretch reflex in the cat. *Experimental Neurology*, 37(3), 481-494.

Feng NH, Lee HH, Shiang JC, Ma MC (2008) Transient receptor potential vanilloid type 1 channels act as mechanoreceptors and cause substance P release and sensory activation in rat kidneys. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 294(2), F316–25.

Fettiplace R, Kim KX (2014) The physiology of mechano-electrical transduction channels in hearing. *Physiological Reviews*, 94(3), 951–986.



Flock A, Cheung HC (1977) Actin filaments in sensory hairs of inner ear receptor cells. *Journal of Cell Biology*, 75(2), 339–343.

Forbes DJ, Welt C (1981) Neurogenesis in the trigeminal ganglion of the albino rat: a quantitative autoradiographic study. *Journal of Comparative Neurology*, 199, 133–147.

Foss I, Flottorp G (1974) A comparative study of the development of bearing and vision of various species commonly used in experiments. *Acta Oto-Laryngologica*, 77(1-6), 202-214.

Freeman S, Plotnik M, Elidan J, Sohmer H (1999) Development of short latency vestibular evoked potentials in the neonatal rat. *Hearing Research*, 137(1-2), 51–58.

Furness DN, Hackney CM (1985) Cross-links between stereocilia in the guinea pig cochlea. *Hearing Research*, 18(2), 177–188.

Furness DN, Zetes DE, Hackney CM, Steele CR (1997) Kinematic analysis of shear displacement as a means for operating mechanotransduction channels in the contact region between adjacent stereocilia of mammalian cochlear hair cells. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences*, 264(1378), 45–51.

Furness DN, Hackney CM (2006) *The structure and composition of the stereociliary bundle of vertebrate hair cells*. In: *Vertebrate Hair Cells*, edited by RA Eatock, RR Fay, AN Popper. New York: Springer, p. 95–153.

García-Mesa Y, Feito J, Cuendias P, García-Piqueras J, Germanà A, García-Suarez O, Martín-Biedma B, Vega JA (2022) The acquisition of mechanoreceptive competence by human digital merkel cells and sensory corpuscles during development: An immunohistochemical study of piezo2. *Annals of Anatomy*, 243, 151953.

García-Piqueras J, García-Mesa Y, Cárcaba L, Feito J, Torres-Parejo I, Martín-Biedma B, Cobo J, García-Suárez O, Vega JA (2019) Ageing of the somatosensory system at the periphery: age-related changes in cutaneous mechanoreceptors. *Journal of Anatomy*, 234(6), 839–852.

Gdowski GT, McCrea RA (2000) Neck proprioceptive inputs to primate vestibular nucleus neurons. *Experimental Brain Research*, 135(4), 511-526.

Ge J, Li W, Zhao Q, Li N, Chen M, Zhi P, Li R, Gao N, Xiao B, Yang M (2015) Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel. *Nature*, 527(7576), 64-69.

Geisler CD (1998) *From Sound to Synapse, Physiology of the Mammalian Ear*. New York: Oxford University Press.

Geleoc GS et Holt JR (2003) Developmental acquisition of sensory transduction in hair cells of the mouse inner ear. *Nature Neuroscience*, 6(10), 1019–1020.

Gemmell RT, Nelson J (1992) Development of the vestibular and auditory system of the northern native cat, *Dasyurus hallucatus*. *The Anatomical Record*, 234(1), 136–143.

Gemmell RT, Nelson J (1989) Vestibular system of the newborn marsupial cat *Dasyurus hallucatus*. *Anatomical Record*, 225(3), 203–208.

Gemmell RT, Peters B, Nelson J (1988) Ultrastructural identification of Merkel cells around the mouth of the newborn marsupial. *Anatomy and Embryology*, 177(5), 403–408.

Gillespie PG, Müller U (2009) Mechanotransduction by hair cells: models, molecules, and mechanisms. *Cell*, 139(1), 33-44.

Gingras J, Cabana T (1999) Synaptogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord in the postnatal opossum, *Monodelphis domestica*. *The Journal of Comparative Neurology*, 414(4), 551–560.

Gonzalez R, Hamblin MH, Lee JP (2016) Neural Stem Cell Transplantation and CNS Diseases. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 15(8), 881–6.

Goodyear RJ, Marcotti W, Kros CJ, Richardson GP (2005) Development and properties of stereociliary link types in hair cells of the mouse cochlea. *The Journal of Comparative Neurology*, 485(1), 75–85.

Goodyear RJ, Richardson GP (2002) Extracellular matrices associated with the apical surfaces of sensory epithelia in the inner ear: Molecular and structural diversity. *Journal of Neurobiology*, 53(2), 212–227.

Gopen Q, Lopez I, Ishiyama G, Baloh RW, Ishiyama A (2003). Unbiased stereologic type I and type II hair cell counts in human utricular macula. *Laryngoscope*, 113(7), 1132–1138.

Grillner S (1975) Locomotion in vertebrates: central mechanisms and reflex interaction. *Physiological Reviews*, 55(2), 247-304.

Groves AK (2005) The induction of the otic placode. In: *Development of the Inner Ear*. New York: Springer, p. 10–42.

Gubbels SP, Woessner DW, Mitchell JC, Ricci AJ, Brigande JV (2008) Functional auditory hair cells produced in the mammalian cochlea by in utero gene transfer. *Nature*, 455(7212), 537-541.

Gudipaty SA, Lindblom J, Loftus PD, Redd MJ, Edes K, Davey CF, Krishnegowda V, Rosenblatt J (2017) Mechanical stretch triggers rapid epithelial cell division through Piezo1. *Nature*, 543(7643), 118–21.

Guiler ER (1970) Observation on the Tasmanian devil, *Sarcophilus harrisii* (Marsupialia, Dasyuridae). II. Reproduction, breeding and growth of pouch young. *Australian Journal of Zoology*, 18, 63-70.

Güler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M, Caterina M (2002) Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *The Journal of Neuroscience*, 22(15), 6408–14.

Guo R, Li Y, Liu J, Gong S, Liu K (2021) Complete elimination of peripheral auditory input before onset of hearing causes long-lasting impaired social memory in mice. *Frontiers in Neuroscience*, 15(72 3658), 1-11.

Guo YR, MacKinnon R (2017) Structure-based membrane dome mechanism for Piezo mechanosensitivity. *eLife*, 6, e33660.

Hackney CM, Fettiplace R, Furness DN (1993) The functional morphology of stereociliary bundles on turtle cochlear hair cells. *Hearing Research*, 69(1-2), 163–175.

Hackney CM, Furness DN (1995) Mechanotransduction in vertebrate hair cells: structure and function of the stereociliary bundle. *American Journal of Physiology*, 268(1 Pt 1), C1–C13.

Hamill OP, Martinac B (2001) Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiological Reviews*, 81(2), 685–740.

Hao J, Padilla F, Dandonneau M, Lavebratt C, Lesage F, Noël J, Delmas P (2013) Kv1.1 channels act as mechanical brake in the senses of touch and pain. *Neuron*, 77(5), 899–914.

Harder JD, Stonebrook MJ, Pondy J (1993) Gestation and placentation in two New World opossums: *Didelphis virginiana* and *Monodelphis domestica*. *Journal of Experimental Zoology*, 266(5), 463–479.

Hartman CG (1920) Studies in the development of the opossum *Didelphys virginiana* L. V. The phenomena of parturition. *The Anatomical Record*, 19(5), 251–261.

Hasko JA, Richardson GP (1988) The ultrastructural organization and properties of the mouse tectorial membrane matrix. *Hearing Research*, 35(1), 21–38.

Heidrych P, Zimmermann U, Kuhn S, Franz C, Engel J, Duncker SV, Hirt B, Pusch CM, Ruth P, Pfister M, Marcotti W, Blin N, Knipper M (2009) Otoferlin interacts with myosin VI: implications for maintenance of the basolateral synaptic structure of the inner hair cell. *Human Molecular Genetics*, 18(15), 2779–2790.

Hertzano R, Montcouquiol M, Rashi-Elkeles S, Elkon R, Yücel R, Frankel WN, Rechavi G, Möröy T, Friedman TB, Kelley MW, Avraham KB (2004) Transcription profiling of inner ears from *Pou4f3*(ddl/ddl) identifies *Gf11* as a target of the *Pou4f3* deafness gene. *Human Molecular Genetics*, 13(18), 2143–2153.

Hertzano R, Shalit E, Rzadzinska AK, Dror AA, Song L, Ron U, Tan JT, Shitrit AS, Fuchs H, Hasson T, Ben-Tal N, Sweeney HL, de Angelis MH, Steel KP, Avraham KB (2008) A *Myo6* mutation destroys coordination between the myosin heads, revealing new functions of myosin VI in the stereocilia of mammalian inner ear hair cells. *PLoS Genetics*, 4(10), e1000207.

Hilaire C, Lucas O, Valmier J, Scamps F (2012) Neurotrophin-4 modulates the mechanotransducer Cav3.2T-type calcium current in mice down-hair neurons. *Biochemical Journal*, 441(1), 463–71.

Hillman DE (1969) New ultrastructural findings regarding a vestibular ciliary apparatus and its possible functional significance. *Brain Research*, 13(2), 407–412.

Holst MC, Ho RH, Martin GF (1991) The origins of supraspinal projections to lumbosacral and cervical levels of the spinal cord in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Brain, Behavior and Evolution*, 38(6), 273-289.

Hong K, Driscoll M (1994) A transmembrane domain of the putative channel subunit MEC-4 influences mechanotransduction and neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature*, 367(6462), 470–3.

Hour NL (2017) Étude anatomique de la relation entre les neurones exprimant l’hormone de relâche des gonadotrophines et le nerf terminal lors du développement postnatal de l’opossum (*Monodelphis domestica*) (Mémoire de maîtrise inédit). Université de Montréal.

Hudspeth AJ, Corey DP (1977) Sensitivity, polarity, and conductance change in the response of vertebrate hair cells to controlled mechanical stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(6), 2407–2411.

Hudspeth AJ (1982) Extracellular current flow and the site of transduction by vertebrate hair cells. *The Journal of Neuroscience*, 2(1), 1–10.

Hudspeth AJ (1989) How the ear’s works work. *Nature*, 341(6241), 397–404.

Hughes RL, Hall LS (1984) Embryonic development in the common brushtail possum *Trichosurus vulpecula*. In: Smith AP, Hume ID, editors. *Possums and gliders*. Sydney: Australian Mammal Society. p.197-212.

Hughes RL, Hall LS (1988) Structural adaptations of the newborn marsupial. In: Tyndale-Biscoe H, Janssens PA, editors. *The developing marsupial*. New York: Springer-Verlag. p 8–27.

Huh SH, Jones J, Warchol ME, Ornitz DM (2012) Differentiation of the lateral compartment of the cochlea requires a temporally restricted FGF20 signal. *PLoS Biology*, 10(1), e1001231.

Iizuka-Kogo A (2018) Spatiotemporal coordination of cellular differentiation and tissue morphogenesis in organ of Corti development. *Medical Molecular Morphology*, 51(2), 65-81.

Ikeda R, Pak K, Chavez E, Ryan AF (2015) Transcription factors with conserved binding sites near ATOH1 on the POU4F3 gene enhance the induction of cochlear hair cells. *Molecular Neurobiology*, 51(2), 672-684.

Jaramillo F, Hudspeth AJ (1991) Localization of the hair cells transduction channels at the hair bundles top by iontophoretic application of a channel blocker. *Neuron*, 7(3), 409–420.

Jarman AP, Grau Y, Jan LY, Jan YN (1993) Atonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the Drosophila peripheral nervous system. *Cell*, 73(7), 1307-1321.

Jarman AP, Grell EH, Ackerman L, Jan LY, Jan YN (1994) Atonal is the proneural gene for Drosophila photoreceptors. *Nature*, 369(6479), 398-400.

Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, Gouaux E (2007) Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature*, 449(7160), 316–323.

Jenkins BA, Fontecilla NM, Lu CP, Fuchs E, Lumpkin EA (2019) The cellular basis of mechanosensory Merkel-cell innervation during development. *eLIFE*, 8, e42633, 1-24.

Johnson KO (2001) The roles and functions of cutaneous mechanoreceptors. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(4), 455-461.

Johnson SL, Marcotti W, Kros CJ (2005) Increase in efficiency and reduction in Ca<sup>2+</sup> dependence of exocytosis during development of mouse inner hair cells. *The Journal of Physiology*, 563(1), 177–191.

Jones TE, Munger BL (1985) Early differentiation of the afferent nervous system in glabrous snout skin of the opossum (*Monodelphis domestica*). *Somatosensory Research*, 3(2), 169–184.

Kahle W, Frotscher M (2002) *Atlas de poche d'anatomie, 3. Système nerveux et organes des sens* (3<sup>e</sup> éd ; traduit par Vitte, É. et Hasboun, D.). Paris : Médecine-Science Flammarion.

Kakizawa S, Yamasaki M, Watanabe M, Kano M (2000) Critical period for activity-dependent synapse elimination in developing cerebellum. *The Journal of Neuroscience*, 20(13), 4954–4961.

- Kamajaya A, Kaiser JT, Lee J, Reid M, Rees DC (2014) The structure of a conserved piezo channel domain reveals a topologically distinct beta sandwich fold. *Structure*, 22(10), 1520–1527
- Kandel E (2013, 6 septembre) The new science of mind. *The New York Times Sunday Review*.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell MT, Siegelbaum SA, Hudspeth A (2012) *Principles of neural science* (5th ed.). New York: McGraw-Hill, Health Professions Division. 1709p.
- Kang L, Gao J, Schafer WR, Xie Z, Xu XZ (2010) C. elegans TRP family protein TRP-4 is a pore-forming subunit of a native mechanotransduction channel. *Neuron*, 67(3), 381–91.
- Kang H, Hong Z, Zhong M, Klomp J, Bayless KJ, Mehta, Karginov AV, Hu G, Malik AB (2019) Piezo1 mediates angiogenesis through activation of MT1-MMP signaling. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 316(1), C92–103.
- Kappler JA, Starr CJ, Chan DK, Kollmar R, Hudspeth AJ (2004) A nonsense mutation in the gene encoding a zebrafish myosin VI isoform causes defects in hair-cell mechanotransduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(35), 13056–13061.
- Kasumacic N, Lambert FM, Coulon P, Bras H, Vinay L, Perreault MC, Glover JC (2015) Segmental organization of vestibulospinal inputs to spinal interneurons mediating crossed activation of thoracolumbar motoneurons in the neonatal mouse. *The Journal of Neuroscience*, 35(21), 8158–69.
- Kawashima Y, Géléoc GS, Kurima K, Labay V, Lelli A, Asai Y, Makishima T, Wu DK, Della Santina CC, Holt JR, Griffith AJ (2011) Mechanotransduction in mouse inner ear hair cells requires transmembrane channel-like genes. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(12), 4796–4809.
- Kelley MW (2007) Cellular commitment and differentiation in the organ of corti. *The International Journal of Developmental Biology*, 51(6-7), 571-583.
- Kiehn O (2006) Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annual Review of Neuroscience*, 29, 279–306.

Kim SE, Coste B, Chadha A, Cook B, Patapoutian A (2012) The role of Drosophila Piezo in mechanical nociception. *Nature*, 483(7388), 209–212.

Kim KX, Beurg M, Hackney CM, Furness DN, Mahendrasingam S, Fettiplace R (2013) The role of transmembrane channel-like proteins in the operation of hair cell mechanotransducer channels. *The Journal of General Physiology*, 142(5), 493–505.

Kim KX, Fettiplace R (2013) Developmental changes in the cochlear hair cell mechanotransducer channel and their regulation by transmembrane channel-like proteins. *The Journal of General Physiology*, 141(1), 141–148.

Kindt KS, Finch G, Nicolson T (2012) Kinocilia mediate mechanosensitivity in developing zebrafish hair cells. *Developmental Cell*, 23(2), 329–341.

Kitajiri S, Sakamoto T, Belyantseva IA, Goodyear RJ, Stepanyan R, Fujiwara I, Bird JE, Riazuddin S, Riazuddin S, Ahmed ZM, Hinshaw JE, Sellers J, Bartles JR, Hammer JA, Richardson GP, Griffith AJ, Frolenkov GI, Friedman TB (2010) Actin-bundling protein TRIOBP forms resilient rootlets of hair cell stereocilia essential for hearing. *Cell*, 141(5), 786–798.

Kraichely RE, Strege PR, Sarr MG, Kendrick ML, Farrugia G (2009) Lysophosphatidyl choline modulates mechanosensitive L-type Ca<sup>2+</sup> current in circular smooth muscle cells from human jejunum. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(4), G833–9.

Krause WJ (1991) The vestibular apparatus of the opossum (*Didelphis virginiana*) prior to and immediately after birth. *Acta Anatomica*, 142(1), 57–59.

Krey JF, Sherman NE, Jeffery ED, Choi D, Barr-Gillespie PG (2015) The proteome of mouse vestibular hair bundles over development. *Scientific Data*, 2, 150047.

Krey JF, Krystofiak ES, Dumont RA, Vijayakumar S, Choi D, Rivero F, Kachar B, Jones SM, Barr-Gillespie PG (2016) Plastin 1 widens stereocilia by transforming actin filament packing from hexagonal to liquid. *Journal of Cell Biology*, 215(4), 467–482.



Krey JF, Barr-Gillespie PG (2018) Molecular composition of vestibular hair bundles. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(1), a033209.

Krey JF, Chatterjee P, Dumont RA, O’Sullivan M, Choi D, Bird JE, Barr-Gillespie P (2020) Mechanotransduction – dependent control of stereocilia dimensions and row identity in inner hair cells. *Current Biology*, 30(3), 442-454.e7.

Kros CJ, Rüscher A, Richardson GP (1992) Mechano- electrical transducer currents in hair cells of the cultured neonatal mouse cochlea. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences*, 249(1325), 185–193.

Kros CJ, Rüscher A, Lennan GWT, Richardson GP (1993) Voltage dependence of transducer currents in outer hair cells of neonatal mice. In *Biophysics of hair cell sensory systems* (ed. Duifhuis H, Horst JW, van Dijk P et van Netten SM), pp. 141–150. Singapore: World Scientific.

Kros CJ, Lennan GWT, Richardson GP (1995) Transducer currents and bundle movements in outer hair cells of neonatal mice. In *Active hearing* (ed. Ar . Flock) pp. 113–125. Oxford: Elsevier Science.

Kurima K, Peters LM, Yang Y, Riazuddin S, Ahmed ZM, Naz S, Arnaud D, Drury S, Mo J, Makishima T et al. (2002) Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function. *Nature Genetics*, 30(3), 277-284.

Laforge J, Pflieger JF (2018) Distribution of the mechanically activated channel Piezo2 in the facial skin of developing opossums, *Monodelphis domestica*. Program No. 642.23 2018 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2018. (conférence internationale, présentation par affiche).

Laforge J, Pflieger, JF (2019) Expression du mécanorécepteur Piezo2 lors du développement de la tête chez l’opossum, *Monodelphis domestica*. XXIXe Symposium du Département de Sciences Biologiques de l’Université de Montréal. Montréal, QC. (présentation orale).

Lai CH, Tse YC, Shum DKY, Yung KKL, Chan YS (2004) Fos expression in otolith-related brainstem neurons of postnatal rats following off-vertical axis rotation. *The Journal of Comparative Neurology*, 470(3), 282–96.

Lai SK, Lai CH, Yung KKL, Shum DKY, Chan YS (2006) Maturation of otolith-related brainstem neurons in the detection of vertical linear acceleration in rats. *The European Journal of Neuroscience*, 23(9), 2431–2446.

Lamarck JB (1809) *Philosophie Zoologique*, vol. 2. 450p.

Lambert FM, Bras H, Cardoit L, Vinay L, Coulon P, Glover JC (2016) Early postnatal maturation in vestibulospinal pathways involved in neck and forelimb motor control. *Developmental Neurobiology*, 76(10), 1061–77.

Lamoureux S, Gingras J, Cabana T (2005) Myelogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord of the opossum *Monodelphis domestica*. *Brain, Behavior and Evolution*, 65, 143–156.

Langworthy OR (1928) The behavior of pouch-young opossums correlated with the myelination of tracts in the nervous system. *Journal of Comparative Neurology*, 46(1), 201–247.

Lannou J, Precht W, Cazin L (1979) The postnatal development of functional properties of central vestibular neurons in the rat. *Brain Research*, 175(2), 219–232.

Lanthier\* F, Laforge\* J, Pflieger JF (2022) Functional development of the vestibular system of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *The Journal of Comparative Neurology*, article soumis.

Lanthier F (2017) *Développement fonctionnel du système vestibulaire chez l'opossum Monodelphis domestica* (Mémoire de maîtrise inédit). Université de Montréal.

Larsell O, McCrady E, Zimmermann A (1935) Morphological and functional development of the membranous labyrinth in the opossum. *Journal of Comparative Neurology*, 63(1), 95-118.

Lee W, Leddy HA, Chen Y, Lee SH, Zelenski NA, McNulty AL, Wu J, Beicker NK, Coles J, Zauscher S, Grandl J, Sachs F, Guilak F, Liedtke WB (2014) Synergy between Piezo1 and Piezo2 channels confers high-strain mechanosensitivity to articular cartilage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(47), E5114-E5122.

Legan PK, Goodyear RJ, Morin M, Mencia A, Pollard H, Olavarrieta L, Korchagina J, Modamio-Hoybjor S, Mayo F, Moreno F, Moreno-Pelayo MA, Richardson GP (2014) Three deaf mice: Mouse models for TECTA-based human hereditary deafness reveal domain-specific structural phenotypes in the tectorial membrane. *Human Molecular Genetics*, 23(10), 2551–2568.

Legan PK, Rau A, Keen JN, Richardson GP (1997) The mouse tectorins. Modular matrix proteins of the inner ear homologous to components of the sperm-egg adhesion system. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(13), 8791–8801.

Legan PK, Richardson GP (1997) Extracellular matrix and cell adhesion molecules in the developing inner ear. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 8(3), 217–224.

Lelli A, Asai Y, Forge A, Holt JR, Géléoc GS (2009) Tonotopic gradient in the developmental acquisition of sensory transduction in outer hair cells of the mouse cochlea. *Journal of Neurophysiology*, 101(6), 2961–2973.

Lewis AH, Grandl J (2015) Mechanical sensitivity of Piezo1 ion channels can be tuned by cellular membrane tension. *eLife*, 4, e12088.

Li CW, Ruben RJ (1979) Further study of the surface morphology of the embryonic mouse cochlear sensory epithelia. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 87(4), 479–485.

Li CW, Van De Water TR, Ruben RJ (1978) The fate mapping of the eleventh and twelfth day mouse otocyst: an in vitro study of the sites of origin of the embryonic inner ear sensory structures. *Journal of Morphology*, 157(3), 249–267.

Liedtke W, Choe Y, Martí-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S (2005) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*, 103(3), 525–35.

Liang X, Qiu X, Dionne G, Cunningham CL, Pucak ML, Peng G, Kim YH, Lauer A, Shapiro L, Müller U (2021) CIB2 and CIB3 are auxiliary subunits of the mechanotransduction channel of hair cells. *Neuron*, 109(13), 2131–2149.

- Lin W, Laitko U, Juranka PF, Morris CE (2007) Dual stretch responses of mHCN2 pacemaker channels: accelerated activation, accelerated deactivation. *Biophysical Journal*, 92(5), 1559–72.
- Liu Z, Owen T, Zhang L, Zuo J (2010) Dynamic expression pattern of Sonic hedgehog in developing cochlear spiral ganglion neurons. *Developmental Dynamics*, 239(6), 1674–1683.
- Lukashkin AN, Legan PK, Weddell TD, Lukashkina VA, Goodyear RJ, Welstead LJ, Petit C, Russell IJ, Richardson GP (2012) A mouse model for human deafness DFNB22 reveals that hearing impairment is due to a loss of inner hair cell stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(47), 19351–19356.
- Lumpkin EA, Marshall KL, Nelson AM (2010) The cell biology of touch. *Journal of Cell Biology*, 191(2), 237e248.
- Lynen F, Wieland U (1938) Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes. IV. *Justus Liebig's Annalen der Chem.* 533(1), 93–117.
- Maeda R, Kindt KS, Mo W, Morgan CP, Erickson T, Zhao H, Clemens-Grisham R, Barr-Gillespie PG, Nicolson T (2014) Tip-link protein protocadherin 15 interacts with transmembrane channel-like proteins TMC1 and TMC2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Amedica*, 111(35), 12907-12912.
- Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E (1999) Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *Journal of Biological Chemistry*, 274(38), 26691–26696.
- Maklad A, Fritzsich B (2003) Development of vestibular afferent projections into the hindbrain and their central targets. *Brain Research Bulletin*, 60(5-6), 497–510.
- Maksimovic S, Nakatani M, Baba Y, Nelson AM, Marshall KL, Wellnitz SA, Firozi P, Woo SH, Ranade S, Patapoutian A, Lumpkin EA (2014) Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature*, 509, 617-621.
- Manley GA (2000) Cochlear mechanisms from a phylogenetic viewpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 97(22), 11736–11743.

Marcotti W, Johnson SL, Holley MC, Kros CJ (2003) Developmental changes in the expression of potassium currents of embryonic, neonatal and mature mouse inner hair cells. *The Journal of Physiology*, 548(Pt.2), 383–400.

Marcotti W, Corns LF, Desmonds T, Kirkwood NK, Richardson GP, Kros CJ (2014) Transduction without tip links in cochlear hair cells is mediated by ion channels with permeation properties distinct from those of the mechano-electrical transducer channel. *The Journal of Neuroscience*, 34(16), 5505–5514.

Maricich SM, Wellnitz SA, Nelson AM, Lesniak DR, Gerling GJ, Lumpkin EA, Zoghbi HY (2009) Merkel cells are essential for light-touch responses. *Science*, 324(5934), 1580–1582.

Maricich SM, Morrison KM, Mathes EL, Brewer BM (2012) Rodents rely on Merkel cells for texture discrimination tasks. *The Journal of Neuroscience*, 32(10), 3296–3300.

Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP (2005) TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nature Cell Biology*, 7(2), 179–85.

Marshall KL, Saade D, Ghitani N, Coombs AM, Szczot M, Keller J, Ogata T, Daou I, Stowers LT, Bönnemann CG, Chesler AT, Patapoutian A (2020) Piezo2 in sensory neurons and urothelial cells coordinates urination. *Nature*, 588(7837), 290–295.

Martin KEA, Mackay S (2003) Postnatal development of the fore- and hindlimbs in the grey short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Journal of Anatomy*, 202(1), 143–152.

Matei V, Pauley S, Kaing S, Rowitch D, Beisel KW, Morris K, Feng F, Jones K, Lee J, Fritsch B (2005) Smaller inner ear sensory epithelia in Neurog 1 null mice are related to earlier hair cell cycle exit. *Developmental Dynamics*, 234(3), 633–650.

Mbiene JP, Favre D, Sans A (1984) The pattern of ciliary development in fetal mouse vestibular receptors: a qualitative and quantitative SEM study. *Anatomy and Embryology*, 170(3), 229–238.

Mbiene JP, Sans A (1986) Differentiation and maturation of the sensory hair bundles in the fetal and postnatal vestibular receptors of the mouse: a scanning electron microscopy study. *The Journal of Comparative Neurology*, 254(2), 271–278.

McCluskey SU, Marotte LR, Ashwell KWS (2008) Development of the vestibular apparatus and central vestibular connections in a wallaby (*Macropus eugenii*). *Brain, Behavior and Evolution*, 71(4), 271–286.

McCarter GC, Reichling DB, Levine JD (1999) Mechanical transduction by rat dorsal root ganglion neurons in vitro. *Neuroscience Letters*, 273(3), 179–182.

McCrary, E (1938) *The american anatomical memoirs no.16 : The embryology of the opossum*. Philadelphia, États-Unis : The Wistar Institute of Anatomy and Biology.

McKenzie E, Krupin A, Kelley MW (2004) Cellular growth and rearrangement during the development of the mammalian organ of Corti. *Developmental Dynamics*, 229(4), 802–812.

McKinley MP, O’Loughlin VD, Bidle TS (2014) *Anatomie et physiologie : Une approche intégrée* (traduit par Bélanger D, Cordeau M, Des Serres A, Devito M, Laflamme MA, Morin S, Tarini L). Montréal, Canada : Chenelière Éducation.

McIlwrath SL, Hu J, Anirudhan G, Shin JB, Lewin GR (2005) The sensory mechanotransduction ion channel ASIC2 (acid sensitive ion channel 2) is regulated by neurotrophin availability. *Neuroscience*, 131(2), 499–511.

Melak M, Plessner M, Grosse R (2017) Actin visualization at a glance. *Journal of Cell Science*, 130(3), 525–530.

Meyer AC, Moser T (2010) Structure and function of cochlear afferent innervation. *Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery*, 18(5), 441–446.

Michalski N, Michel V, Bahloul A, Lefèvre G, Barral J, Yagi H, Chardenoux S, Weil D, Martin P, Hardelin JP, Sato M, Petit C (2007) Molecular characterization of the ankle-link complex in cochlear hair cells and its role in the hair bundle functioning. *The Journal of Neuroscience*, 27(24), 6478 – 6488.

Mikaelian D, Ruben RJ (1965) Development of hearing in the normal CBA-J mouse: Correlation of physiological observations with behavioral responses and with cochlear anatomy. *Acta Otolaryngologica*, 59(2-6),451-461.

- Mirnic K, Koerber HR (1995) Prenatal development of rat primary afferent fibers. II. Central projections. *The Journal of Comparative Neurology*, 355(4), 601-614.
- Moll I, Roessler M, Brandner JM, Eispert AC, Houdek P, Moll R (2005) Human Merkel cells - aspects of cell biology, distribution and functions. *European Journal of Cell Biology*, 84(2-3), 259–271.
- Montcouquiol M, Kelley MW (2003) Planar and vertical signals control cellular differentiation and patterning in the mammalian cochlea. *Journal of Neuroscience*, 23(28), 9469–9478.
- Moore DR (1982) Late onset of hearing in the ferret. *Brain Research*, 253(1-2), 309-311.
- Morita H, Honda A, Inoue R, Ito Y, Abe K, Nelson MT, Brayden JE (2007) Membrane stretch-induced activation of a TRPM4-like nonselective cation channel in cerebral artery myocytes. *Journal of Pharmacological Sciences*, 103(4), 417–26.
- Morsli H, Choo D, Ryan A, Johnson R, Wu DK (1998) Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs. *The Journal of Neuroscience*, 18(9), 3327-3335.
- Murthy SE, Loud MC, Daou I, Marshall KL, Schwaller F, Kühnemund J, Francisco AG, Keenan WT, Dubin AE, Lewin GR, Patapoutian A (2018) The mechanosensitive ion channel Piezo2 mediates sensitivity to mechanical pain in mice. *Science Translation Medicine*, 10(462), eaat9897.
- Nagel G, Neugebauer DC, Schmidt B, Thurm U (1991) Structures transmitting stimulatory forces to the sensory hairs of vestibular ampullae of frogs and fishes. *Cell and Tissue Research*, 265(3), 567–578.
- Nayak GD, Ratnayaka HSK, Goodyear RJ, Richardson GP (2007) Development of the hair bundle and mechanotransduction. *The International Journal of Developmental Biology*, 51(6-7), 597–608.
- Nazıroğlu M (2022) A novel antagonist of TRPM2 and TRPV4 channels: Carvacrol. *Metabolic Brain Disease*, 37(3), 711-728.
- Nelson JE (1992) Developmental staging in a marsupial *Dasyurus hallucatus*. *Anatomy and Embryology Berlin*, 185(4), 335-354.

Nelson J, Gemmell R (2004) Implications of Marsupial Births for an Understanding Behavioural Development. *International Journal of Comparative Psychology*, 17, 53-70.

Numata T, Shimizu T, Okada Y (2007) TRPM7 is a stretch- and swelling-activated cation channel involved in volume regulation in human epithelial cells. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 292(1), C460–7.

Ohmori H (1985) Mechano-electrical transduction currents in isolated vestibular hair cells of the chick. *The Journal of Physiology*, 359, 189–217.

Olszewski J (1950) On the anatomical and functional organization of the spinal trigeminal nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, 92(3), 401–413.

O'Rahilly R (1979) Early human development and the chief sources of information on staged human embryos. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 9(4), 273-80.

Otis EM et Brent R (1954) Equivalent ages in mouse and human embryos. *The Anatomical Record*, 120(1), 33-63.

Pacentine IV, Nicolson T (2019) Subunits of the mechano-electrical transduction channel, Tmc1/2b, require Tmie to localize in zebrafish sensory hair cells. *PLoS Genetics*, 15, e1007635.

Pan N, Jahan I, Kersigo J, Kopecky B, Santi P, Johnson S, Schmitz H, Fritsch B (2011) Conditional deletion of *Atoh1* using Pax2-Cre results in viable mice without differentiated cochlear hair cells that have lost most of the organ of Corti. *Hearing Research*, 275(1-2), 66-80.

Pan B, Akyuz N, Liu XP, Asai Y, Nist-Lund C, Kurima K, Derfler BH, György B, Limapichat W, Walujkar S, Wimalasena LN, Sotomayor M, Corey DP, Holt JR (2018) TMC1 forms the pore of mechanosensory transduction channels in vertebrate inner ear hair cells. *Neuron*, 99(4), 736–753.e6.

Pan B, Géléoc GS, Asai Y, Horwitz GC, Kurima K, Ishikawa K, Kawashima Y, Griffith AJ, Holt JR (2013) TMC1 and TMC2 are components of the mechanotransduction channel in hair cells of the mammalian inner ear. *Neuron*, 79(3), 504–15.



- Pangrsic T, Lasarow L, Reuter K, Takago H, Schwander M, Riedel D, Frank T, Tarantino LM, Bailey JS, Strenzke N, Brose N, Müller U, Reisinger E, Moser T (2010) Hearing requires otoferlin-dependent efficient replenishment of synaptic vesicles in hair cells. *Nature Neuroscience*, 13(7), 869–876.
- Parrad PJ, Cottureau P (1977) Apparition des réactions rotatoires chez le rat nouveau-né. *Physiology and Behavior*, 18(6), 1017–1020.
- Pathak MM, Nourse JL, Tran T, Hwe J, Arulmoli J, Le DT, Bernardis E, Flanagan LA, Tombola F (2014) Stretch-activated ion channel Piezo1 directs lineage choice in human neural stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(45), 16148–53.
- Pellis SM, Pellis VC, Nelson JE (1992) The development of righting reflexes in the pouch young of the marsupial *Dasyurus hallucatus*. *Developmental Psychobiology*, 25(2), 105–25.
- Peng Z, Wang GP, Zeng R, Guo JY, Chen CF, Gong SS (2013) Temporospatial expression and cellular localization of VGLUT3 in the rat cochlea. *Brain Research*, 1537, 100–110.
- Peterson BW, Abzug C (1975) Properties of projections from vestibular nuclei to medial reticular formation in the cat. *Journal of Neurophysiology*, 38(6), 1421–1435.
- Peterson BW, Maunz RA, Pitts NG, Mackel RG (1975) Patterns of projection and branching of reticulospinal neurons. *Experimental Brain Research*, 23(4), 333–351.
- Pflieger JF, Cabana T (1996) The vestibular primary afferents and the vestibulospinal projections in the developing and adult opossum, *Monodelphis domestica*. *Anatomy and Embryology*, 194(1), 75–88.
- Pflieger JF, Cassidy G, Cabana T (1996) Development of spontaneous locomotor behaviors in the opossum *Monodelphis domestica*. *Behavioural Brain Research*, 80(1–2), 137–143.
- Phan H, Pflieger JF (2013) Immunolocalization of cation-chloride cotransporters in the developing and mature spinal cord of opossums, *Monodelphis domestica*. *Frontiers in Neuroanatomy*, 7, 1–10.

Pickles JO, Comis SD, Osborne MP (1984) Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. *Hearing Research*, 15(2), 103–112.

Pickles JO, Corey DP (1992) Mechano-electrical transduction by hair cells. *Trends in Neurosciences*, 15(7), 254–259.

Pollard TD, Cooper JA (2009) Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, 326(5957), 1208–1212.

Pompeiano O (1972) Spinovestibular relations: anatomical and physiological aspects. *Progress in Brain Research*, 37, 263-296.

Prichett KR, Taft RA (2007) *Reproductive biology of the mouse*. In *The mouse in biomedical research: Normative biology, husbandry and models*. Amsterdam, the Netherlands: Academic Press, Vol. 3, pp. 91–121.

Prole DL, Taylor CW (2013) Identification and analysis of putative homologues of mechanosensitive channels in pathogenic protozoa. *PLoS ONE* 8, e66068.

Pujol R, Lavigne-Rebillard M, Lenoir M (1998) *Development of sensory and neural structures in the mammalian cochlea*. In: *Development of the Auditory System*, edited by Rubel EW, Popper AN, Fay RR. New York: Springer-Verlag. p. 146 –193.

Puzzolo E, Mallamaci A (2010) Cortico-cerebral histogenesis in the opossum *Monodelphis domestica*: generation of a hexalaminar neocortex in the absence of a basal proliferative compartment. *Neural Development*, 5, 8.

Pysh JJ (1969) The development of the extracellular space in neonatal rat inferior colliculus: an electronmicroscopic study. *American Journal of Anatomy*, 124(4) 411-430.

Qin YQ, Wang XM, Martin GF (1993) The early development of major projections from caudal levels of the spinal cord to the brainstem and cerebellum in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Brain Research, Developmental Brain Research*, 75(1), 75–90.

Qiu X, Müller U (2018) Mechanically gated ion channels in mammalian hair cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(100), 1-10.

Ranade SS, Qiu Z, Woo SH, Hur SS, Murthy SE, Cahalan SM, Xu J, Mathur J, Bandell M, Coste B, Li YSJ, Chien S, Patapoutian A (2014a) Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(28), 10347-10352.

Ranade SS, Woo SH, Dubin AE, Moshourab RA, Wetzel C, Petrus M, Mathur J, Bégay V, Coste B, Mainquist J, Wilson AJ, Francisco AG, Reddy K, Qui Z, Wood JN, Lewin GR, Patapoutian A (2014b) Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice. *Nature*, 156(7529), 121-125.

Reimer K (1995) Ontogeny of hearing in the marsupial, *Monodelphis domestica*, as revealed by brainstem auditory evoked potentials. *Hearing Research*, 92(1-2), 143–150.

Retailleau K, Duprat F, Arhatte M, Ranade SS, Peyronnet R, Martins JR, Jodar M, Moro C, Offermanns S, Feng Y, Demolombe S, Patel A, Honoré E (2015) Piezo1 in Smooth Muscle Cells Is Involved in Hypertension- Dependent Arterial Remodeling. *Cell Reports*, 13(6), 1161–71.

Rhoades RW, Enfiejian HL, Chiaia NL, Macdonald GJ, Miller MW, McCann P, Goddard CM (1991) Birthdates of trigeminal ganglion cells contributing axons to the infraorbital nerve and specific vibrissal follicles in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 307(1), 163–175.

Rice FL, Albrecht PJ (2008) *Cutaneous mechanisms of tactile perception: morphological and chemical organization of the innervation to the skin*. In *The Senses, A Comprehensive Reference*. San Diego: Academic Press, pp. 1–32.

Richardson GP, Petit C (2019) Hair-bundle links: genetics as the gateway to function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(12), 1-21.

Rodat-Despoix L, Delmas P (2009) Ciliar functions in the nephron. *Pflugers Archiv*, 458(1), 179-187.

Rode B, Shi J, Endesh N, Drinkhill MJ, Webster PJ, Lotteau SJ, Bailey MA, Yuldasheva NY, Ludlow MJ, Cubbon RM, Li J, Futers TS, Morley L, et al. (2017) Piezo1 channels sense whole body physical activity to reset cardiovascular homeostasis and enhance performance. *Nature Communication*, 8(1), 350.

Roux I, Safieddine S, Nouvian R, Grati M, Simmler M-C, Bahloul A, Perfettini I, Le Gall M, Rostaing P, Hamard G, Triller A, Avan P, Moser T, Petit C (2006) Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell Press*, 127(2), 277–289.

Roux I, Hosie S, Johnson SL, Bahloul A, Cayet N, Nouaille S, Kros CJ, Petit C, Safieddine S (2009) Myosin VI is required for the proper maturation and function of inner hair cell ribbon synapses. *Human Molecular Genetics*, 18(23), 4615–4628.

Ruben RJ (1967) Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses. *Acta Oto-laryngologica*, 220, 1–44.

Russell EM (1982) Patterns of parental care and parental investment in marsupials. *Biological Reviews*, 57(3), 423–486.

Sacco R, Cacci E, Novarino G (2018) Neural stem cells in neuropsychiatric disorders. *Current Opinion in Neurobiology*, 48, 131–8.

Sánchez-Villagra MR, Gemballa S, Nummela S, Smith KK, Maier W (2002) Ontogenetic and phylogenetic transformations of the ear ossicles in marsupial mammals. *Journal of Morphology*, 251(3), 219–238.

Sans A, Chat M (1982) Analysis of temporal and spatial patterns of rat vestibular hair cell differentiation by tritiated thymidine radioautography. *The Journal of Comparative Neurology*, 206(1), 1–8.

Saotome K, Murthy SE, Kefauver JM, Whitwam T, Patapoutian A, Ward AB (2018) Structure of the mechanically activated ion channel Piezo1. *Nature*, 554(7693), 481–6.

Saunders NR, Adam E, Reader M, Møllgård K (1989) *Monodelphis domestica* (grey short-tailed opossum): an accessible model for studies of early neocortical development. *Anatomy and Embryology*, 180(3), 227–236.

Scheffer DI, Shen J, Corey DP, Chen ZY (2015) Gene Expression by Mouse Inner Ear Hair Cells during Development. *The Journal of Neuroscience*, 35(16), 6366–6380.

Schneider NY, Fletcher TP, Shaw G, Renfree MB (2009) The olfactory system of the tammar wallaby is developed at birth and directs the neonate to its mother's pouch odours. *Reproduction*, 138(5), 849–57.

Schneider NY (2011) The development of the olfactory organs in newly hatched monotremes and neonate marsupials. *Journal of Anatomy*, 219(2), 229–242.

Seal RP, Akil O, Yi E, Weber CM, Grant L, Yoo J, Clause A, Kandler K, Noebels JL, Glowatzki E, Lustig LR, Edwards RH (2008) Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. *Neuron*, 57(2), 263–275.

Shankland, W. E. (2000). The Trigeminal Nerve. Part I: An Over-View. *Cranio*, 18(4), 238–248.

Sharif-Naeini R, Dedman A, Folgering JH, Duprat F, Patel A, Nilius B, Honore E (2008) TRP channels and mechanosensory transduction: insights into the arterial myogenic response. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 456(3), 529–540.

Shepherd GM (1994) *Neurobiology* (3th ed.). New York: Oxford University Press.

Shin JB, Streijger F, Beynon A, Peters T, Gadzala L, McMillen D, Bystrom C, Van der Zee CE, Wallimann T, Gillespie PG (2007) Hair bundles are specialized for ATP delivery via creatine kinase. *Neuron*, 53(3), 371–386.

Shin JB, Longo-Guess CM, Gagnon LH, Saylor KW, Dumont RA, Spinelli KJ, Pagana JM, Wilmarth PA, David LL, Gillespie PG, Johnson KR (2010) The R109H variant of fascin-2, a developmentally regulated actin crosslinker in hair-cell stereocilia, underlies early-onset hearing loss of DBA/2J mice. *The Journal of Neuroscience*, 30(29), 9683–9694.

Shin JB, Krey JF, Hassan A, Metlagel Z, Tauscher AN, Paganà JM, Sherman NE, Jeffery ED, Spinelli KJ, Zhao H, Wilmarth PA, Choi D, David LL, Auer M, Barr-Gillespie PG (2013) Molecular architecture of the chick vestibular hair bundle. *Nature Neuroscience*, 16(3), 365–374.

Shotwell SL, Jacobs R, Hudspeth AJ (1981) Directional sensitivity of individual vertebrate hair cells to controlled deflection of their hair bundles. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 374(1), 1-10.

Simon É, Perrot X, Mertens P (2009) Anatomie fonctionnelle du nerf cochléaire et du système auditif central. *Neurochirurgie*, 55, 120-126.

Slowik AD, Bermingham-McDonogh O (2016) A central to peripheral progression of cell cycle exit and hair cell differentiation in the developing mouse cristae. *Developmental Biology*, 411(1), 1–14.

Smith KT (2001) Early development of the neural plate, neural crest and facial region of marsupials. *Journal of Anatomy*, 199, 121-131.

Smith KK, Keyte AL (2019) Adaptations of the marsupial newborn: Birth as an extreme environment. *The Anatomical Record*, 0(0), 1-15.

Smith CL (1983) The development and postnatal organization of primary afferent projections to the rat thoracic spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology*, 220(1), 29- 43.

Spassova MA, Hewavitharana T, Xu W, Soboloff J, Gill DL (2006) A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), 16586–91.

Sun Y, Chen CS, Fu J (2012) Forcing stem cells to behave: A biophysical perspective of the cellular microenvironment. *Annual Review of Biophysics*, 41, 519–42.

Suzue T (1996) Movements of mouse fetuses in early stages of neural development studied in vitro. *Neuroscience Letters*, 218(2), 131-134.

Taberner FJ, Prato V, Schaefer I, Schrenk-Siemens K, Heppenstall PA, Lechner SG (2019) Structure-guided examination of the mechanogating mechanism of Piezo2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(28), 14260–14269.

Tadenev ALD, Akturk A, Devanney N, Mathur PD, Clark AM, Yang J, Tarchini B (2019) GPSM2-GNAI specifies the tallest stereocilia and defines hair bundle row identity. *Current Biology*, 29(6), 921–934.e4.

Taylor JSH, Guillery RW (1994) Early development of the optic chiasm in the gray short tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Journal of Comparative Neurology*, 350(1), 109–121.

Teudt IU, Richter CP (2014) Basilar membrane and tectorial membrane stiffness in the CBA/CAJ mouse. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 15(5), 675–694.

Tilney LG, Tilney MS, DeRosier DJ (1992) Actin filaments, stereocilia, and hair cells: how cells count and measure. *Annual Review of Cell Biology*, 8, 257–274.

Tilney LG, Tilney MS, Cotanche DA (1988) Actin filaments, stereocilia, and hair cells of the bird cochlea. V. How the staircase pattern of stereociliary lengths is generated. *Journal of Cell Biology*, 106(2), 355–365.

Tilney LG, Tilney MS (1986) Functional organization of the cytoskeleton. *Hearing Research*, 22(1-3), 55–77.

Toda T, Kawasaki H (2014) The development of suckling behavior of neonatal mice is regulated by birth. *Molecular Brain*, 7(8), 1-8.

Tsuprun V, Santi P (2002) Structure of outer hair cell stereocilia side and attachment links in the chinchilla cochlea. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50(4), 493–502.

Tsuprun V, Schachern PA, Cureoglu S, Paparella M (2003) Structure of the stereocilia side links and morphology of auditory hair bundle in relation to noise exposure in the chinchilla. *Journal of Neurocytology*, 32(9), 1117–1128.

Tyndale-Biscoe CH, Renfree MB (1987) *Reproductive physiology of marsupials*. New York : Cambridge University Press.

- Uchino Y, Sato H, Zakir M, Kushiro K, Imagawa M, Ogawa Y, Ono S, Meng H, Zhang X, Katsuta M, Isu N, Wilson VJ (2001) Commissural effects in the otolith system. *Experimental Brain Research*, 136(4), 421-430.
- VandeBerg JL, Robinson ES (1997) The Laboratory Opossum (*Monodelphis Domestica*) in Laboratory Research. *ILAR Journal*, 38(1), 4–12.
- Vandeberg JL, Williams-Blangero S (2010) The Laboratory Opossum. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*, 8, 246–261.
- Van Exan RJ, Hardy MH (1980) A spatial relationship between innervation and the early differentiation of vibrissa follicles in the embryonic mouse. *Journal of Anatomy*, 131(4), 643-656.
- Vater M, Lenoir M (1992) Ultrastructure of the horseshoe bat's organ of Corti. I. Scanning electron microscopy. *The Journal of Comparative Neurology*, 318(4), 367–379.
- Velasco-Estevez M, Gadalla KKE, Liñan-Barba N, Cobb S, Dev KK, Sheridan GK (2020) Inhibition of Piezo1 Attenuates Demyelination in the Central Nervous System. *Glia*, 68(2), 356–375.
- Venkataraman Y, Bartlett EL (2013) Postnatal development of synaptic properties of the GABAergic projection from the inferior colliculus to the auditory thalamus. *Journal of Neurophysiology*, 109(12), 2866-2882.
- Ventre J, Faugier-Grimaud S (1988) Projections of the temporo-parietal cortex on vestibular complex in the macaque monkey (*Macaca fascicularis*). *Experimental Brain Research*, 72(3), 653-658.
- Verpy E, Leibovici M, Michalski N, Goodyear RJ, Houdon C, Weil D, Richardson GP, Petit C (2011) Stereocilin connects outer hair cell stereocilia to one another and to the tectorial membrane. *The Journal of Comparative Neurology*, 519(2), 194–210.
- Vreugde S, Erven A, Kros CJ, Marcotti W, Fuchs H, Kurima K, Wilcox ER, Friedman TB, Griffith AJ, Balling R, De Angelis MH, Avraham KB, Steel KP (2002) Beethoven, a mouse model for dominant, progressive hearing loss DFNA36. *Nature Genetics*, 30(3), 257-258.



Waguespack J, Salles FT, Kachar B, Ricci AJ (2007) Stepwise morphological and functional maturation of mechanotransduction in rat outer hair cells. *The Journal of Neuroscience*, 27(50), 13890–13902.

Waite PME, Ho SM, Henderson TA (2000) Afferent ingrowth and onset of activity in the rat trigeminal nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 12(8), 2781–2792.

Waite PME, Marotte LR, Leamey C A (1994) Timecourse of Development of the Wallaby Trigeminal Pathway. I. Periphery to Brainstem. *Journal of Comparative Neurology*, 350, 75–95.

Wallis D, Hamblen M, Zhou Y, Venken KJT, Schumacher A, Grimes HL, Zoghbi HY, Orkin SH, Bellen HJ (2003) The zinc finger transcription factor Gfi1, implicated in lymphomagenesis, is required for inner ear hair cell differentiation and survival. *Development*, 130(1), 221–232.

Wang XM, Xu XM, Qin YQ, Martin GF (1992) The origins of supraspinal projections to lumbosacral and cervical levels of the spinal cord in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Developmental Brain Research*, 68(2), 203–16.

Watt FM, Huck WT (2013) Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), 467–73.

Webb SW, Grillet N, Andrade LR, Xiong W, Swarthout L, Della Santina CC, Kachar B, Muller U (2011) Regulation of PCDH15 function in mechanosensory hair cells by alternative splicing of the cytoplasmic domain. *Development*, 138(8), 1607–1617.

Wei Q, Manley NR, Condie BG (2011) Whole mount *in situ* hybridation of E8.5 to E11.5 mouse embryos. *Journal of Visualized Experiments*, 56, e2797.

Weinbaum S, Duan Y, Satlin LM, Wang T, Weinstein AM (2010) Mechanotransduction in the renal tubule. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 299(6), F1220–36.

Wersall J (1956) Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the crista ampullares in the guinea pig. *Acta Oto-Laryngologica Supplement*, 126, 1–85.

Wieland T, Govindan VM (1974) Phallotoxins bind to actins. *FEBS Letters*, 46(1-2), 351–353.

Wilmarth PA, Krey JF, Shin JB, Choi D, David LL, Barr-Gillespie PG (2015) Hair-bundle proteomes of avian and mammalian inner-ear utricles. *Scientific Data*, 2, 150074.

Witschi E. *Rat Development. In: Growth Including Reproduction and Morphological Development.* (1962) Altman P et Dittmer DS. Federation of American Societies for Experimental Biology, Washington DC, p. 304-314.

Woo SH, Ranade S, Weyer AD, Dubin AE, Baba Y, Qiu, Z, Petrus M, Miyamoto T, Reddy K, Lumpkin EA, Stucky CL, Patapoutian A (2014) Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature*, 509(7502), 622-626.

Woo SH, Lukacs V, de Nooij JC, Zaytseva D, Criddle CR, Francisco A, Jessell TM, Wilkinson KA, Patapoutian A (2015) Piezo2 is the principal mechanotransduction channel for proprioception. *Nature Neuroscience*, 18(12):1756–62.

Woods C, Montcouquiol M, Kelley MW (2004) Math1 regulates development of the sensory epithelium in the mammalian cochlea. *Nature Neuroscience*, 7(12), 1310-1318.

Wu Z, Grillet N, Zhao B, Cunningham C, Harkins-Perry S, Coste B, Ranade S, Zebajardi N, Beurg M, Fettiplace R, Patapoutian A, Mueller U (2017) Mechanosensory hair cells express two molecularly distinct mechanotransduction channels. *Nature Neuroscience*, 20(1), 24–33.

Yamashita T, Zheng F, Finkelstein D, Kellard Z, Carter R, Rosencrance CD, Sugino K, Easton J, Gawad C, Zuo J (2018) High-resolution transcriptional dissection of in vivo Atoh1-mediated hair cell conversion in mature cochleae identifies Isl1 as a co-reprogramming factor. *PLoS Genetics*, 14(7), e1007552.

Yariz KO, Duman D, Seco CZ, Dallman J, Huang M, Peters TA, et al. (2012). Mutations in OTOGL, encoding the inner ear protein otogelin-like, cause moderate sensorineural hearing loss. *American Journal of Human Genetics*, 91(5), 872–882.

Zarychanski R, Schulz VP, Houston BL, Maksimova Y, Houston DS, Smith B, Rinehart J, Gallagher PG (2012) Mutations in the mechanotransduction protein Piezo1 are associated with hereditary xerocytosis. *Blood*, 120(9), 1908–1915.

Zhang WK, Wang D, Duan Y, Loy MM, Chan HC, Huang P (2010) Mechanosensitive gating of CFTR. *Nature Cell Biology*, 12(5), 507–12.

Zhang M, Wang Y, Geng J, Zhou S, Xiao B (2019) Mechanically Activated Piezo Channels Mediate Touch and Suppress Acute Mechanical Pain Response in Mice. *Cell Reports*, 26(6), 1419–31.

Zhao B, Wu Z, Grillet N, Yan L, Xiong W, Harkins-Perry S, Müller U (2014) TMIE is an essential component of the mechanotransduction machinery of cochlear hair cells. *Neuron*, 84(5), 954–967.

Zhao H, Sokabe M (2008) Tuning the mechanosensitivity of a BK channel by changing the linker length. *Cell Research*, 18(8), 871–8.

Zhao Q, Zhou H, Chi S, Wang Y, Wang J, Geng J, Wu K, Liu W, Zhang T, Dong MQ, Wang J, Li X, Xiao B (2018) Structure and mechanogating mechanism of the Piezo1 channel. *Nature* 554(7693), 487–492.

Zheng L, Sekerková G, Vranich K, Tilney LG, Mugnaini E, Bartles JR (2000) The deaf jerker mouse has a mutation in the gene encoding the espin actin-bundling proteins of hair cell stereocilia and lacks espins. *Cell*, 102(3), 377–385.

Zheng L, Zheng J, Whitlon DS, García-Añoveros J, Bartles JR (2010) Targeting of the hair cell proteins cadherin 23, harmonin, myosin XVa, espin, and prestin in an epithelial cell model. *The Journal of Neuroscience*, 30(21), 7187–7201.

Zheng J, Miller KK, Yang T, Hildebrand MS, Shearer AE, DeLuca AP, Scheetz TE, Drummond J, Scherer SE, Legan PK, Goodyear RJ, Richardson GP, Cheatham MA, Smith RJ, Dallos P (2011). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 interacts with alpha-tectorin and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DFNA4). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(10), 4218–4223.

Zimmerman A, Bai L, Ginty DD (2014) The gentle touch receptors of mammalian skin. *Science*, 346(6212), 950–954.

Zwaenepoel I, Mustapha M, Leibovici M, Verpy E, Goodyear R, Liu XZ, Nouaille S, Nance WE, Kanaan M, Avraham KB, Tekaiia F, Loiselet J, Lathrop M, Richardson G, Petit C (2002) Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), 6240–6245.