

Thesis, COLLÉGIALITÉ, FRANZEN Rachelle

Auteur : Cornet, Théo

Promoteur(s) : 17473; Malgrange, Brigitte

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

Année académique : 2024-2025

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/23260>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Rôle de MMP2 et MMP9 dans l'audition

Année académique 2024 – 2025

Laboratoire de Neurobiologie du développement



Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de Master en Sciences
Biomédicales

CORNET Théo

Dr. DELACROIX Laurence
P. MALGRANGE Brigitte
SPAHIC Enes

Abstract

The architecture of the cochlea relies on a specialized extracellular matrix (ECM), whose integrity is essential for proper auditory function. Mutations affecting several genes encoding its components have been associated with forms of deafness, highlighting the importance of tissue remodeling processes in cochlear pathophysiology. In this project, we focused on two major regulators of the matrix, the matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9, which belong to the gelatinase family.

Since MMP2 polymorphisms have been linked to early-onset presbycusis in humans, we studied the progression of auditory function over time in wild-type (WT) and MMP2 knock-out (KO) mice to assess its role in this process. Auditory brainstem responses (ABR) revealed that in the absence of MMP2, hearing was normal at 8 weeks of age. However, from the 12th week onward, KO mice exhibited better hearing at high frequencies, and age-related hearing decline was significantly delayed at all later time points tested. Further investigations will be needed to understand how the absence of ECM remodeling by MMP2 might confer protection against presbycusis.

Moreover, since inflammation is known to induce ECM remodeling and modulate gelatinase expression in various tissues, we explored its impact on cochlear expression of MMP2 and MMP9 in two distinct contexts. In the first model, inflammation was induced ex vivo by IL-1 β : this cytokine did not alter MMP2 transcription but strongly and progressively induced MMP9 transcription as early as 2 hours after treatment, along with increased protein accumulation in the hair cell region. In the second model, we evaluated the in vivo effects of acoustic trauma on the expression of both enzymes. A mild inflammatory response was triggered, and RT-qPCR data showed only a slight and transient increase in both gelatinases. However, immunofluorescence analysis revealed protein accumulation of MMP2 in bony structures, as well as increased MMP9 in the organ of Corti and spiral ganglion. Overall, our results suggest a differential regulation of the two gelatinases by cochlear inflammation, although further studies are needed to deepen these observations.

Résumé

L'architecture de la cochlée repose sur une matrice extracellulaire (MEC) spécialisée, dont l'intégrité est essentielle au bon fonctionnement de l'audition. Des mutations affectant plusieurs gènes codant pour ses composants ont été associées à des formes de surdité, soulignant l'importance des processus de remodelage tissulaire dans la physiopathologie cochléaire. Dans ce projet, nous nous sommes intéressés à deux régulateurs majeurs de la matrice, les métalloprotéinases matricielles MMP2 et MMP9, appartenant à la famille des gélatinases.

Des polymorphismes de MMP2 ayant été associés à l'apparition précoce de la presbycousie chez l'humain, nous avons étudié l'évolution de la fonction auditive au cours du temps chez des souris sauvages (WT) et knock-out (KO) pour MMP2, afin d'évaluer son implication dans ce processus. Les potentiels évoqués auditifs (ABR) ont révélé qu'en l'absence de MMP2, l'audition était normale à 8 semaines. En revanche, à partir de la 12^{ème} semaine, les souris KO entendent mieux pour des sons de hautes fréquences, et le déclin auditif lié au vieillissement est significativement retardé à tous les âges ultérieurs testés. Des investigations complémentaires seront nécessaires pour comprendre comment l'absence de remodelage matriciel par MMP2 pourrait conférer une protection contre la presbycousie.

Par ailleurs, l'inflammation étant connue pour induire un remodelage de la MEC et moduler l'expression des gélatinases dans divers tissus, nous avons exploré son impact sur l'expression cochléaire de MMP2 et MMP9 dans deux contextes distincts. Dans un premier modèle, l'inflammation a été induite ex vivo par l'IL-1 β : cette cytokine n'a pas modifié la transcription de MMP2, mais a fortement et progressivement induit celle de MMP9 dès 2 h de traitement, en plus de provoquer son accumulation protéique dans la région des cellules ciliées. Dans un second modèle, nous avons évalué in vivo les effets d'un traumatisme sonore sur l'expression des deux enzymes. Une réponse inflammatoire modeste a été déclenchée et les données de RT-qPCR n'ont montré qu'une tendance d'augmentation légère et transitoire des deux gélatinases. Les immunofluorescences ont néanmoins révélé une accumulation protéique de MMP2 dans les structures osseuses, ainsi qu'une augmentation de MMP9 dans l'organe de Corti et le ganglion spiral. Globalement, nos résultats suggèrent une régulation différentielle des deux gélatinases par l'inflammation cochléaire, bien que des études supplémentaires soient nécessaires pour approfondir ces observations.

Remerciements

Je tenais d'abord à remercier le Pr. Brigitte Malgrange pour m'avoir permis de réaliser mon mémoire au sein du laboratoire. Merci pour cette expérience enrichissante, durant laquelle j'ai eu la chance de découvrir une équipe formidable, motivée et passionnée, en plus d'avoir appris énormément de chose sur moi-même et le vaste monde qu'est la recherche scientifique.

Merci évidemment au Dr. Laurence Delacroix. Merci Laurence de m'avoir guidé, de m'avoir accompagné dans cette aventure en restant continuellement disponible, pédagogue et à l'écoute. Tes précieux conseils, ta joie et vivre et ta passion guideront encore pendant longtemps mes pas au sein du monde professionnel.

Merci à toi, Enes. Je suis plus que ravi d'avoir pu réaliser cette expérience à tes côtés. Merci pour ta patience, ton soutien constant et ta bonne humeur contagieuse. Malgré l'unique petite année qui nous sépare, j'ai pu voir en toi un véritable mentor et je te souhaite le meilleur pour ton doctorat en Angleterre SLAAAY GURRRRLLLL.

Merci à l'ensemble de l'équipe : PB, Auriane, Sali, Erwan, Timothé, Camille et tous les autres. Votre soutien et vos conseils furent une aide précieuse tout au long de mon séjour au laboratoire. Cette expérience n'aurait pas été la même sans vous.

Merci aussi à Ywenn, Pauline, Jarod et Valentin. Notre petite bande a réellement égayé mes journées et je suis reconnaissant d'avoir pu passer la plupart de ces 5 mois à vos côtés.

Enfin, je voulais finir en remerciant ma famille, ma copine et mes potes du Cercle SBIM TMTC (vous avez d'ailleurs intérêt à tous lire l'entièreté de mon mémoire). À chaque moment de doute, chaque angoisse, vous étiez toujours là pour moi et ça je ne l'oublierai jamais.

Table des Matières

LISTE DES ABRÉVIATIONS	9
INTRODUCTION	1
1. Anatomie générale de l'oreille	2
1.1. La cochlée	2
2. L'organe de Corti	4
2.1. Les cellules ciliées internes	4
2.2. Les cellules ciliées externes	4
2.3. Les cellules de soutien	5
2.4. L'innervation de l'organe de Corti	6
3. La strie vasculaire	7
4. Tonotopie cochléaire	7
5. La matrice extracellulaire et son importance dans la cochlée	8
5.1. La membrane basilaire	9
5.2. La membrane tectoriale	9
5.3. Les filets péri-neuronaux cochléaires	10
6. Surdités et matrice extracellulaire	10
6.1. Surdités génétiques liées à la MEC	11
6.2. Presbyacousie	12
6.3. Surdités liées à l'exposition sonore	12
7. Les métalloprotéinases : une famille multifonctionnelle	13
7.1. Structure et fonction	13
7.2. Régulation des MMPs	14
7.3. Les gélatinases et l'audition	15
HYPOTHÈSES, OBJECTIFS ET STRATÉGIE	16
MATÉRIELS ET MÉTHODES	17
1. Animaux	17
2. Génotypage	17
3. Exposition sonore	18
4. Préparation des cochlées adultes pour l'immunofluorescence	18
5. Préparation des explants cochléaires de souris P3	19
6. Immunofluorescence	19
7. Analyse des images	20

8. Extraction d'ARN et RT-qPCR	21
9. Potentiels évoqués auditifs (ABRs)	23
10. Emissions des produits de distorsion otoacoustiques (DPOAEs)	24
11. Analyses statistiques	25
RÉSULTATS	26
1. Analyse de la fonction auditive au cours du vieillissement chez des souris WT ou KO pour MMP2	26
2. Étude de l'inflammation cochléaire et de son impact sur l'expression des gélatinases	30
2.1. Analyse de l'expression des gélatinases après traitement par IL-1 β ex vivo	30
2.2. Analyse de l'expression des MMPs après un traumatisme sonore	33
2.2.1. Effet du traumatisme sonore sur l'activation microgliale	33
2.2.2. Effet du traumatisme sonore sur le profil d'expression des gélatinases	34
DISCUSSION	38
Le développement cochléaire et le rôle de MMP2	38
MMP2 : un facteur aggravant de la presbycousie chez la souris et l'Homme ?	39
MMP9 est induit dans l'organe de Corti en réponse à l'IL-1β	41
Profil d'expression des gélatinases après traumatisme sonore	42
RÉFÉRENCES	44

Liste des abréviations

ABR	Potentiel évoqué auditif
CC	Cellule ciliée
CCE	Cellule ciliée externe
CCI	Cellule ciliée interne
CSPG	Protéoglycane de chondroïtine sulfate
DP	Produit de distorsion
DPOAE	Emission des produits de distorsion otoacoustiques
h	Heure
J	Jour
KO	Knock-out
MB	Membrane basilaire
MEC	Matrice extracellulaire
MET	Transduction mécano-électrique
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MT	Membrane tectoriale
NGS	Neurone du ganglion spiral
OC	Organe de Corti
PNN	Filet péri-neuronal
TECTA	α -tectorine
TECTB	β -tectorine
TIMP	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases
WT	Sauvage

Introduction

La surdité est un trouble sensoriel majeur qui se caractérise par une perte partielle ou totale de la capacité auditive. Elle peut survenir à tout âge et résulter de diverses causes, telles que des facteurs génétiques, des infections, des traumatismes sonores, le vieillissement, ou encore certaines maladies systémiques. En fonction de son origine, la surdité peut être classée en trois grandes catégories à savoir : la surdité conductive, qui affecte l'oreille externe ou moyenne, la surdité neurosensorielle qui touche la portion auditive de l'oreille interne et la surdité mixte qui est un mélange des deux. La surdité conductive est généralement facilement traitée mais les atteintes de l'oreille interne sont quant à elles irréversibles, car les cellules touchées sont incapables de régénérer. Les répercussions sont majeures, altérant la communication et la qualité de vie, et pouvant, à long terme, conduire à l'isolement social ainsi qu'à des troubles cognitifs, en particulier chez les personnes âgées¹.

Selon l'Organisation mondiale de la santé, plus de 430 millions de personnes dans le monde souffrent d'une perte auditive invalidante, un chiffre qui pourrait atteindre près de 700 millions d'ici 2050. Malgré l'ampleur du problème, de nombreux défis persistent : le diagnostic précoce est encore insuffisant, les traitements disponibles sont limités, et les mécanismes biologiques responsables de la dégénérescence des cellules neurosensorielles sont mal élucidés.

Aujourd'hui, la prise en charge des patients repose sur l'utilisation d'appareils auditifs pour les pertes légères à modérées et d'implants cochléaires pour les surdités profondes. Cependant, ces dispositifs ne restaurent pas une audition naturelle et sont inaccessibles à une large partie de la population mondiale. Dans ce contexte, il est nécessaire d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la surdité neurosensorielle, afin d'ouvrir de nouvelles opportunités de recherche et développer des stratégies de prévention et de thérapie ciblées.

1. Anatomie générale de l'oreille

L'oreille peut être subdivisée en trois parties successives à savoir l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne, lesquelles sont toutes essentielles à l'audition (Figure 1). L'oreille externe sert à guider le son au travers du pavillon puis du canal auditif jusqu'à la membrane tympanique. Celle-ci, en vibrant, permet le mouvement de la chaîne d'osselets de l'oreille moyenne constituée du marteau, de l'enclume et de l'étrier. Ce dernier transmet l'onde sonore vers l'oreille interne au travers de la fenêtre ovale². L'oreille interne est localisée dans l'os temporal et peut être subdivisée en deux parties. La partie dorsale est composée du vestibule et des canaux semi-circulaires. Ils jouent un rôle dans le maintien de l'équilibre, la perception des mouvements et la proprioception³. La partie ventrale et spiralée est composée de la cochlée, qui permet la détection du son.

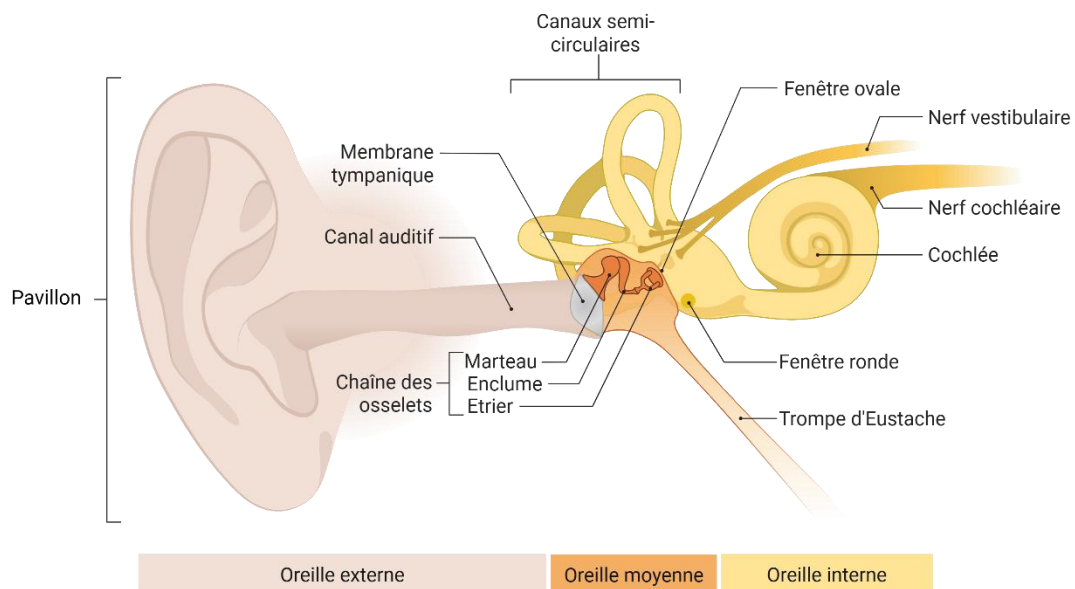


Figure 1 : Anatomie générale de l'oreille.

L'oreille est constituée de trois parties : l'oreille externe, composée du pavillon et du canal auditif, et s'arrêtant au niveau de la membrane tympanique ; l'oreille moyenne, comprenant la chaîne des osselets ; et l'oreille interne, composée de la cochlée, des canaux semi-circulaires et du vestibule. Réalisé sur Biorender.

1.1. La cochlée

La cochlée est une structure tubulaire entourée d'un tissu osseux, la capsule otique, au sein de laquelle se logent trois canaux remplis de fluide et enroulés en spirale (Figure 2). La scala tympani

et la scala vestibuli sont les canaux externes qui contiennent la périlymphe, un liquide physiologique de composition similaire à celle du plasma⁴. La scala media, ou encore canal cochléaire, est un labyrinthe membraneux délimité par trois structures : la membrane de Reissner ; la membrane basilaire (MB), sur laquelle repose l'organe de Corti (OC) et les cellules ciliées ; et la strie vasculaire. Elle est remplie d'endolymphe, un liquide physiologique à la composition singulière, fortement concentré en K^{+5} . L'ensemble repose sur l'axe osseux central, le modiolus, autour duquel la cochlée s'enroule.

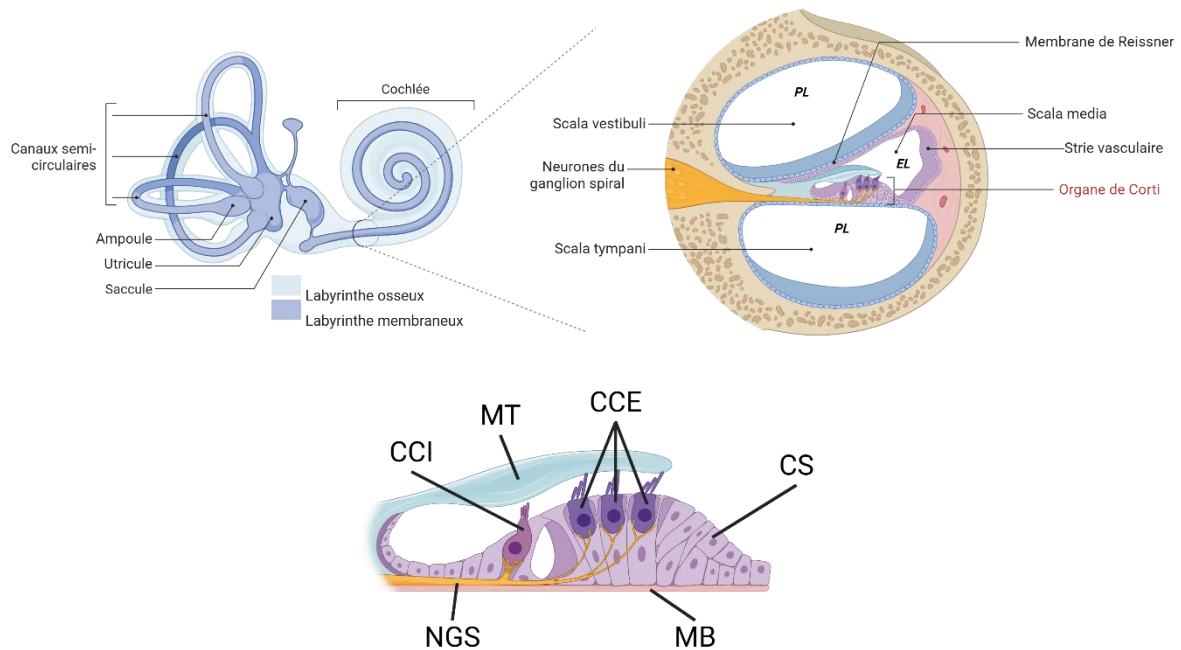


Figure 2 : Organisation anatomique de l'oreille interne et structure de l'organe de Corti.

(A) Représentation schématique de l'oreille interne montrant le labyrinthe osseux (en bleu clair) et le labyrinthe membraneux (en bleu foncé), incluant les canaux semi-circulaires, l'utricule, le saccule et la cochlée.

(B) Coupe transversale de la cochlée mettant en évidence les trois scalas. Elles sont remplies de périlymphe (PL) ou d'endolymphe (EL), et sont séparées entre elles par les membranes de Reissner et basilaire.

(C) Vue agrandie de l'organe de Corti illustrant les cellules ciliées internes (CCI) et externes (CCE), les cellules de soutien (CS) reposant sur la membrane basale (MB), les stéréocils en contact avec la membrane tectoriale (MT), et les fibres nerveuses issues du ganglion spiral (NGS). Réalisé sur Biorender

2. L'organe de Corti

L'organe de Corti est une structure centrale dans l'audition, permettant la conversion du signal sonore en signal électrique interprétable par le cerveau. C'est un épithélium spécialisé, reposant sur la MB et couronné par la membrane tectoriale (MT)⁶. Il est composé de cellules de soutien et de quatre rangées de cellules sensorielles : une rangée de cellules ciliées internes (CCIs), spécialisées dans la détection du son, et trois rangées de cellules ciliées externes (CCEs) permettant l'amplification cochléaire⁷. Chaque cellule ciliée (CC) compte entre 20 et 300 stéréocils à sa membrane apicale, ces derniers prennent une forme en « V » et s'arrangent en trois rangées de taille croissante. Chaque stéréocil est composé de filaments d'actine, dont la base est ancrée dans ce qu'on appelle la plaque cuticulaire, et leur sommet entre en contact avec la MT⁸.

2.1. Les cellules ciliées internes

Les cellules ciliées internes sont les véritables récepteurs sensoriels de l'audition, transformant les vibrations mécaniques en signaux nerveux envoyés au cerveau via le nerf auditif (Figure 3)⁸. Elles forment une seule rangée et sont au nombre de 3500. Lors d'une stimulation sonore, les membranes basilaire et tectoriale vibrent et engendrent la déflexion des stéréocils, provoquant l'ouverture de canaux ioniques spécialisés dans la transduction mécano-électrique du signal, appelés canaux MET. L'ouverture de ces canaux entraîne tout d'abord l'entrée passive d'ions K^+ dans la cellule ciliée, ceux-ci étant fortement concentrés dans l'endolymphe. L'influx de K^+ induit une dépolarisation et permet l'ouverture de canaux Ca^{2+} voltage dépendants⁹. L'entrée de calcium permet l'exocytose des vésicules synaptiques et la libération de glutamate dans la fente synaptique, provoquant la dépolarisation des neurones du ganglion spiral, et donc la transmission du signal auditif, qui sera relayé tout au long de la voie auditive jusqu'au cortex¹⁰.

2.2. Les cellules ciliées externes

Les cellules ciliées externes jouent un rôle clé dans la modulation de la sensibilité auditive et affinent la sélectivité des fréquences perçues. Plus nombreuses, plus grandes et plus fines que les cellules ciliées internes, elles sont au nombre de 12 000 par organe de Corti et organisées en trois rangées¹¹. Suivant la déflexion des stéréocils, ces cellules présentent des propriétés contractiles qui leur permettent de modifier leur longueur d'environ 5 % par rapport à leur taille au repos¹². Grâce à la prestine, une protéine électromotrice localisée dans la membrane basolatérale des cellules (voir Figure 3), les cellules ciliées externes se contractent en réponse à une dépolarisation, amplifiant ainsi le signal transmis au nerf cochléaire en renforçant les vibrations des membranes cochléaires adjacentes^{13 14}.

2.3. Les cellules de soutien

Les cellules de soutien sont essentielles au maintien de la structure et au fonctionnement de l'organe de Corti. Elles sont accrochées à la MB et entourent les cellules ciliées, assurant un rôle dans la stabilité mécanique de l'organe de Corti, l'homéostasie ionique et une transmission efficace des vibrations¹⁵. Il en existe en tout 7 sous-types (voir Figure 3), à savoir les cellules bordantes, les cellules phalangiennes, les cellules piliers (internes et externes), les cellules de Deiter, de Hensen, de Claudius, et enfin du sillon (internes et externes)¹⁶. Chacune de ces cellules est indispensable à l'intégrité mécanique de la cochlée. Les cellules de Deiter, par exemple aident à l'ancrage des cellules ciliées externes et participent avec les cellules piliers à la transmission des ondes mécaniques à travers l'organe de Corti¹⁷. Les cellules de soutien sont reliées entre elles par un réseau de « gap junctions », maintenant l'homéostasie ionique globale de la cochlée et permettant le recyclage du potassium de l'endolymphe. Elles ont également montré un rôle similaire aux macrophages et sont importantes dans la défense antivirale et bactérienne¹⁸. Pour finir, les cellules de soutien pourraient conserver leur capacité à se diviser et se transdifférencier en cellules ciliées, ce qui en fait des cibles intéressantes dans la lutte contre la surdité¹⁹.

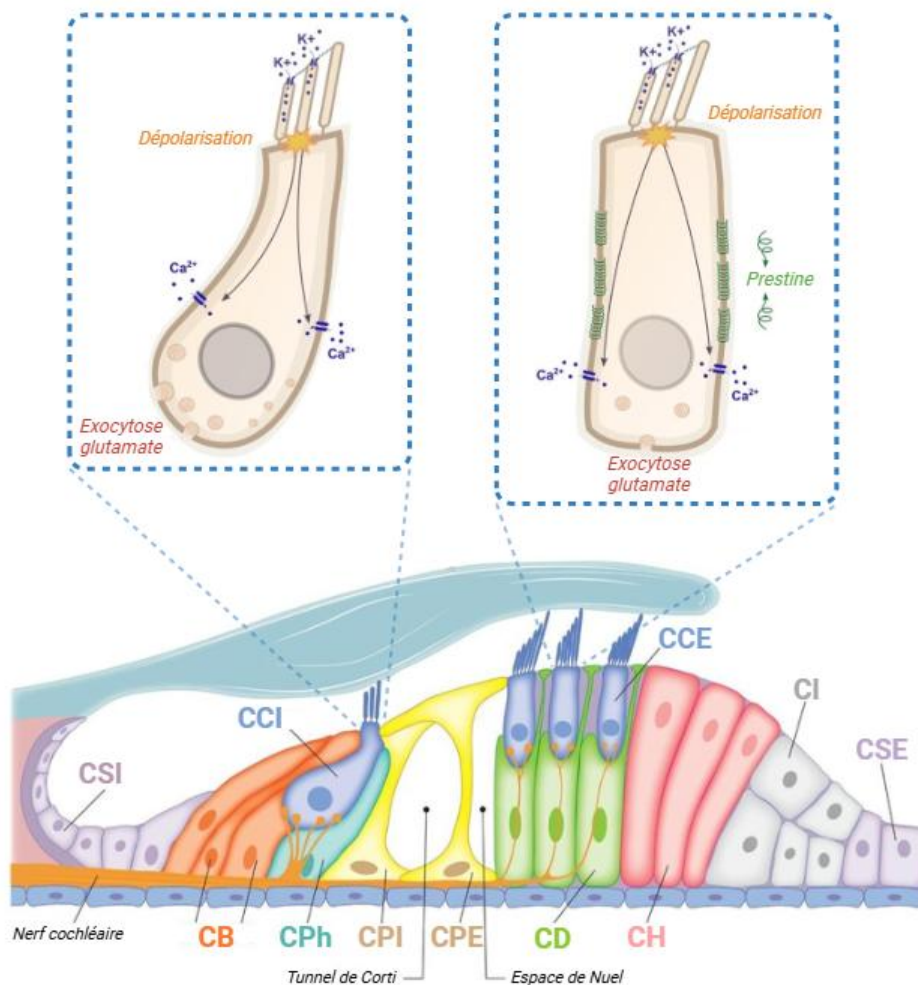


Figure 3 : Organisation cellulaire de l'organe de Corti et mécanisme de transduction sensorielle.

Représentation schématique de l'OC montrant les diverses cellules de soutien à savoir les cellules du sillon internes et externes (CSI, CSE), les cellules bordantes (CB), les cellules phalangiennes (CPh), les cellules piliers internes et externes (CPI, CPE), les cellules de Deiter (CD), de Hensen (CH) et de Claudius (Cl).

Les encarts illustrent les mécanismes de transduction des CCI et CCE : ouverture des canaux K^+ au sommet des stéréocils induisant une dépolarisation, entrée de Ca^{2+} et exocytose de glutamate. La motilité des CCEs est assurée par la protéine électromotrice prestine. Adapté de Jang *et al*²⁰.

2.4. L'innervation de l'organe de Corti

Les afférences proviennent des neurones bipolaires du ganglion spiral (NGS). Leur corps cellulaire est situé dans le modiolus, à distance de l'organe de Corti, vers lequel ils étendent une longue projection périphérique pour contacter les CCs cibles²⁰. Le signal est ensuite transmis via leur axone, formant le nerf cochléaire, jusqu'au premier relais central de la voie auditive. La majorité de l'innervation (95%) est composée de neurones de type I qui contactent les cellules ciliées internes et transmettent l'information auditive vers le tronc cérébral. Ces neurones sont myélinisés, de large diamètre et ciblent individuellement une seule cellule, qui peut recevoir quant à elle jusqu'à 30 afférences²¹. Le contact se fait sous la forme d'une synapse dite en ruban, spécialisée pour une transmission rapide, graduée et soutenue de l'influx. La machinerie présynaptique est en effet organisée autour d'un ruban synaptique, une structure dense aux électrons, composée majoritairement de la protéine Ribeye (appelée aussi Ctbp2). Les nombreuses vésicules remplies de glutamate entourent le ruban et la dépolarisation déclenche une libération rapide, précise et prolongée du neurotransmetteur¹⁰. Les 5% d'innervation restante sont composés par des neurones dits de type II. Ils sont plus fins, non myélinisés et contactent plusieurs cellules ciliées externes « en passant ». Ils sont cependant peu activés par les neurotransmetteurs libérés par ces dernières et semblent jouer un rôle de nociception en cas de traumatisme sonore²².

L'innervation efférente provient du complexe olivaire supérieur du tronc cérébral et module l'activité des cellules ciliées. Les fibres connectées aux cellules ciliées externes libèrent de l'acétylcholine, modulant l'électromotilité cellulaire et l'amplification des mouvements membranaires. D'autres fibres efférentes viennent se connecter aux neurones du ganglion spiral

de type I pour moduler leur activité par des mécanismes encore peu élucidés. Ce système est nécessaire pour protéger les cellules ciliées de stimulations trop intenses et contribue également à améliorer le codage du son dans un environnement bruyant²³.

3. La strie vasculaire

La strie vasculaire est une structure essentielle de la cochlée, localisée sur la paroi latérale du canal cochléaire, le long du ligament spiral, une structure conjonctive bordant la MB. Elle est richement vascularisée et composée de trois types cellulaires : les cellules marginales, basales et intermédiaires. Les cellules marginales sécrètent des ions K^+ dans l'endolymphe qui conserve donc une composition de 150 mM de K^+ , 2 mM de Na^+ et 20 μM de Ca^{2+} , assurant la préservation d'un potentiel endocochléaire élevé, de +80 mV²⁴. Les cellules basales, formant une barrière entre la strie et le ligament spiral, assurent la stabilité structurale tandis que les cellules intermédiaires situées entre les deux types précédents aident à la stabilisation du potentiel cochléaire. L'ensemble communique à l'aide de jonctions communicantes, aidant à la circulation et au recyclage des ions²⁵.

4. Tonotopie cochléaire

La cochlée suit une organisation tonotopique, ce qui signifie que différentes fréquences sonores sont perçues à différents endroits de la cochlée, les hautes fréquences étant perçues à la base et les basses fréquences à son apex (voir Figure 4). Cette organisation est conservée tout le long du trajet de l'influx nerveux jusqu'au cortex auditif²⁶. Celui-ci passe par différents relais du tronc cérébral, à savoir le noyau cochléaire, les noyaux olivaires inférieurs et supérieurs, le noyau du lemniscus latéral et le colliculus inférieur. Dans le thalamus, au niveau du corps genouillé médian, le signal est filtré et finalement transmis au lobe temporal dans le cortex auditif primaire où l'information est traitée.

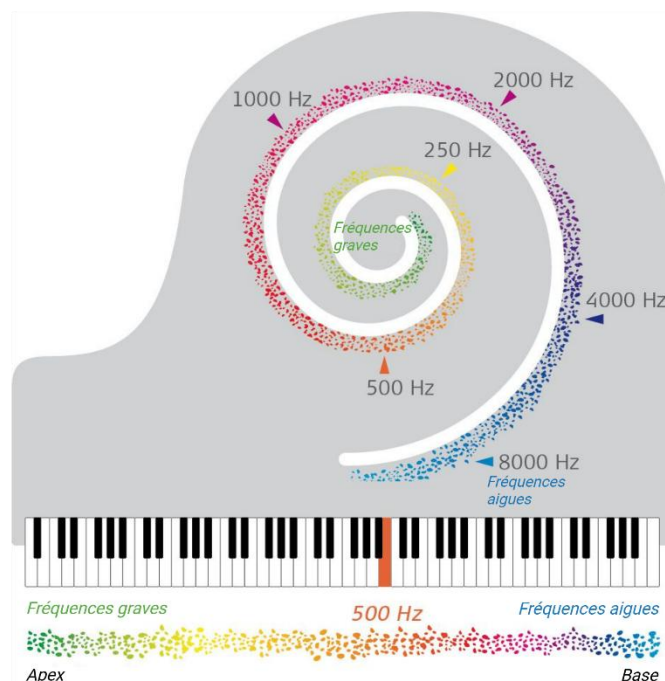


Figure 4 : Organisation tonotopique de la cochlée humaine.

Représentation schématique de la cochlée illustrant sa tonotopie : les hautes fréquences sont détectées à la base, tandis que les basses fréquences sont perçues à l'apex. Cette organisation spatiale des fréquences est comparable au clavier d'un piano, chaque zone cochléaire étant spécialisée dans une bande de fréquences sonores. Adapté de MED-EL Blog²⁷.

5. La matrice extracellulaire et son importance dans la cochlée

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau tridimensionnel de macromolécules entourant les cellules et assurant l'intégrité structurelle et fonctionnelle des tissus (Figure 5)²⁸. Dans la cochlée, elle assure notamment un rôle de support structurel et mécanique, grâce à des protéines fibreuses comme le collagène et l'élastine, qui assurent respectivement résistance mécanique et souplesse tissulaire. Les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes, comme l'acide hyaluronique, assurent viscosité tissulaire et résistance à la compression. Elle joue également un rôle d'ancrage, puisqu'elle contient des glycoprotéines adhésives comme la laminine et la fibronectine, qui relient les différents composants matriciels entre eux et avec les protéines de surface des cellules cochléaires²⁹. Cependant, la MEC est bien plus qu'un support, c'est un compartiment biologiquement actif qui participe à la signalisation via des récepteurs comme les intégrines, intervenant ainsi dans l'homéostasie cellulaire et tissulaire, la morphogénèse, la prolifération ou encore dans la réponse inflammatoire^{30 31}.

Bien qu'elle partage certaines propriétés avec la matrice d'autres compartiments, la MEC cochléaire demeure hautement spécialisée, avec une organisation et une composition qui diffèrent selon les zones de la cochlée³².

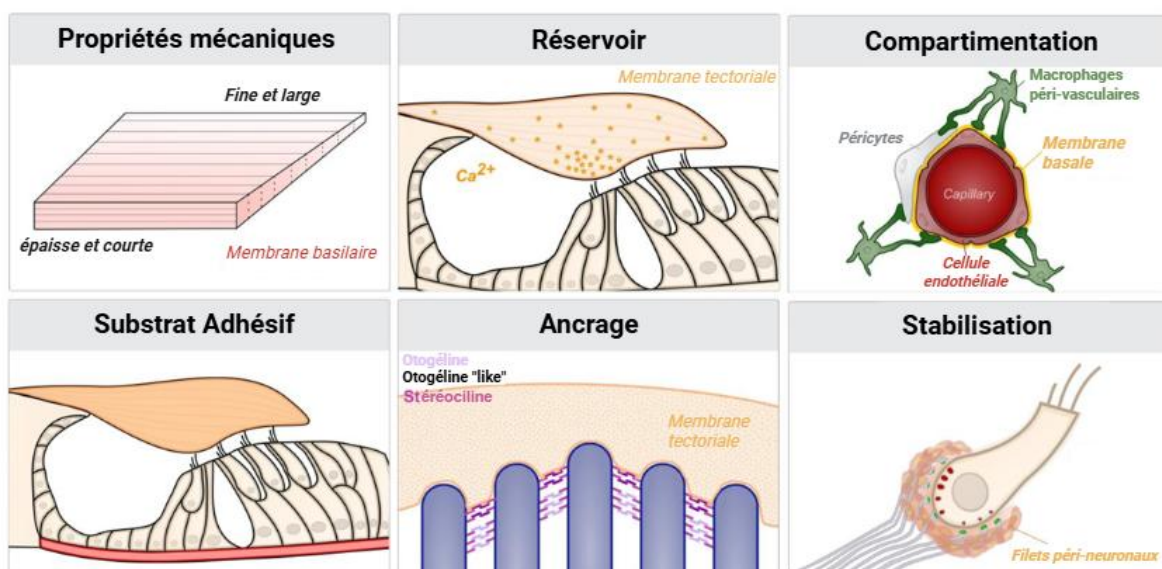


Figure 5 : Les différents rôles de la MEC dans la cochlée.

La membrane basilaire assure la tonotopie cochléaire via des variations topologiques et une composition spécifique de sa MEC. Elle constitue également un substrat adhésif pour les cellules de soutien tout en jouant un rôle de barrière avec les autres compartiments. La membrane tectoriale permet l'ancrage des stéréocils et agit comme un réservoir extracellulaire de Ca^{2+} . Plus globalement, la MEC participe à la stabilisation synaptique via les PNNs et contribue à la compartimentation fonctionnelle de la cochlée. Adapté de Pressé, Malgrange et Delacroix²⁸.

5.1. La membrane basilaire

La membrane basilaire (MB) est une matrice résonnante située sous l'organe de Corti et connectée aux compartiments adjacents tels que le limbus spiral et le ligament spiral. Elle présente une anisotropie structurelle : sa largeur croît et son épaisseur décroît de la base à l'apex, créant un gradient de rigidité responsable de l'organisation tonotopique cochléaire. En outre, localisée en bordure du canal cochléaire, la MB forme une barrière qui limite le transport des fluides et maintient la composition ionique de l'endolymphe³³. La membrane est constituée de quatre couches comportant différents types et organisations de collagènes (majoritairement de type IV, mais aussi II et XI), différentes protéines de structure telles que la laminine, la fibronectine et la glycoprotéine spécifique tenascine-C^{33 34}.

5.2. La membrane tectoriale

Reposant par-dessus les cellules ciliées, la membrane tectoriale (MT) est une structure acellulaire, composée principalement d'eau (97%), d'un réseau dense de fibres de collagène et de glycoprotéines spécifiques³⁵. Cette membrane interagit étroitement avec les stéréocils des cellules ciliées, assurant leur déflexion à travers tout l'organe de Corti³⁶. Son ancrage à l'épithélium est assuré par l'otoancorine, tandis que l'otogéline permet la liaison avec les stéréocils des cellules ciliées externes, favorisant ainsi l'amplification cochléaire^{37 38}. Son épaisseur diminue progressivement de la base vers l'apex de la cochlée, contribuant en partie à la tonotopie cochléaire³⁵. Des glycoprotéines spécifiques, telles que l' α - et β -tectorine (TECTA et TECTB) et les molécules d'adhésion CEACAM16, sont essentielles à l'organisation et à la stabilité de la membrane^{39 40}. Enfin, en plus de son rôle mécanique, la MT constitue un réservoir de calcium, jouant un rôle dans la régulation des canaux de transduction mécano-électrique (MET), essentiels à l'activation des cellules sensorielles⁴¹.

5.3. Les filets péri-neuronaux cochléaires

Les filets péri-neuronaux (PNNs, pour perineural nets en anglais) sont des structures matricielles spécialisées, largement répandues dans le système nerveux central (SNC). Ils entourent les synapses et les corps neuronaux, jouant un rôle clé dans la stabilisation synaptique, la neuroprotection et la plasticité neuronale⁴². Les PNNs sont constitués d'un squelette à base d'acide hyaluronique, de protéoglycanes de chondroïtine sulfate (CSPGs), ainsi que de protéines de liaison, notamment la ténascine R⁴³. Ces différents éléments interagissent pour stabiliser la structure tridimensionnelle du réseau, garantissant une architecture dense et organisée autour des neurones.

Dans la cochlée, les PNNs se concentrent autour des synapses reliant les neurones de type I aux cellules ciliées internes (Figure 6). Leur composition est similaire à celle des PNNs du SNC, à l'exception du fait que le brevican est le CSPG le plus abondant dans la cochlée. Leur fonction exacte reste encore mal comprise, bien que la délétion du brevican soit associée à des troubles auditifs liés à la disparition des PNNs, entraînant des défauts de couplage synaptique. Ainsi, les PNNs cochléaires pourraient jouer un rôle essentiel dans la neurotransmission, notamment en favorisant un couplage spatial optimal de l'appareil pré- et post-synaptique⁴⁴.

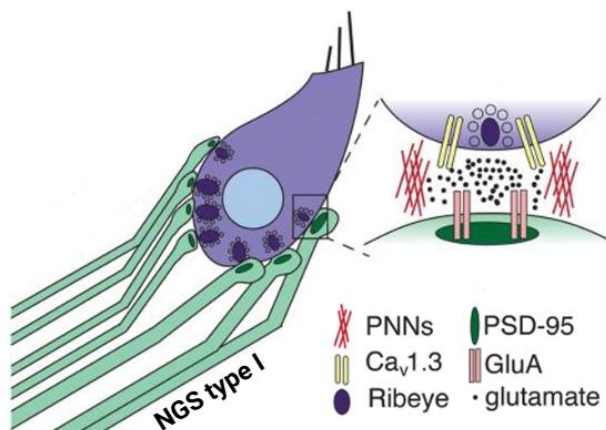


Figure 6 : Les filets péri-neuronaux cochléaires.

Les PNNs cochléaires assurent un soutien mécanique aux synapses en ruban de la cochlée, favorisant leur stabilisation ainsi qu'un relargage précis des neurotransmetteurs. NGS : neurone du ganglion spiral. Adapté de Coate et Conant⁴⁵.

6. Surdités et matrice extracellulaire

À ce jour, plus de 140 gènes ont été découverts comme responsables de formes héréditaires de surdité (Figure 7). Parmi eux, de nombreux gènes codent pour des protéines essentielles à l'intégrité de l'épithélium cochléaire, comme la myosine 7A, une protéine motrice cruciale pour l'organisation et la fonction des stéréocils, ou la connexine 26, une protéine constituant les jonctions communicantes^{46 47}. Puisque la matrice extracellulaire joue un rôle fondamental dans l'organisation, le soutien et la signalisation cellulaire au sein du tissu cochléaire, il n'est pas surprenant de trouver un nombre significatif de gènes de la MEC causatifs de surdités. Outre leur

implication dans les surdités génétiques, des anomalies ou altérations des protéines de la MEC pourraient également contribuer à des formes acquises de déficit auditif, notamment celles liées au vieillissement ou à l'exposition sonore excessive.

6.1. Surdités génétiques liées à la MEC

Une part significative des gènes associés la surdité affecte directement la matrice cochléaire. Dans la MB par exemple, des mutations du gène codant pour la tenascine-C sont impliquées dans la surdité autosomique dominante non syndromique DFNA56 chez l'homme, probablement en perturbant l'homéostasie ionique cochléaire⁴⁷. De même, les protéines spécifiques de la MT, notamment impliquées dans l'organisation de ses fibres de collagène (otoancorine, otogeline, TECTA, CEACAM16), présentent des mutations dans plusieurs formes de surdités non syndromiques chez l'Homme^{39 40 49}. Enfin, les collagènes de type II et IV sont respectivement mutés dans les syndromes de Stickler et d'Alport, tous deux présentant une perte auditive^{50 51}.

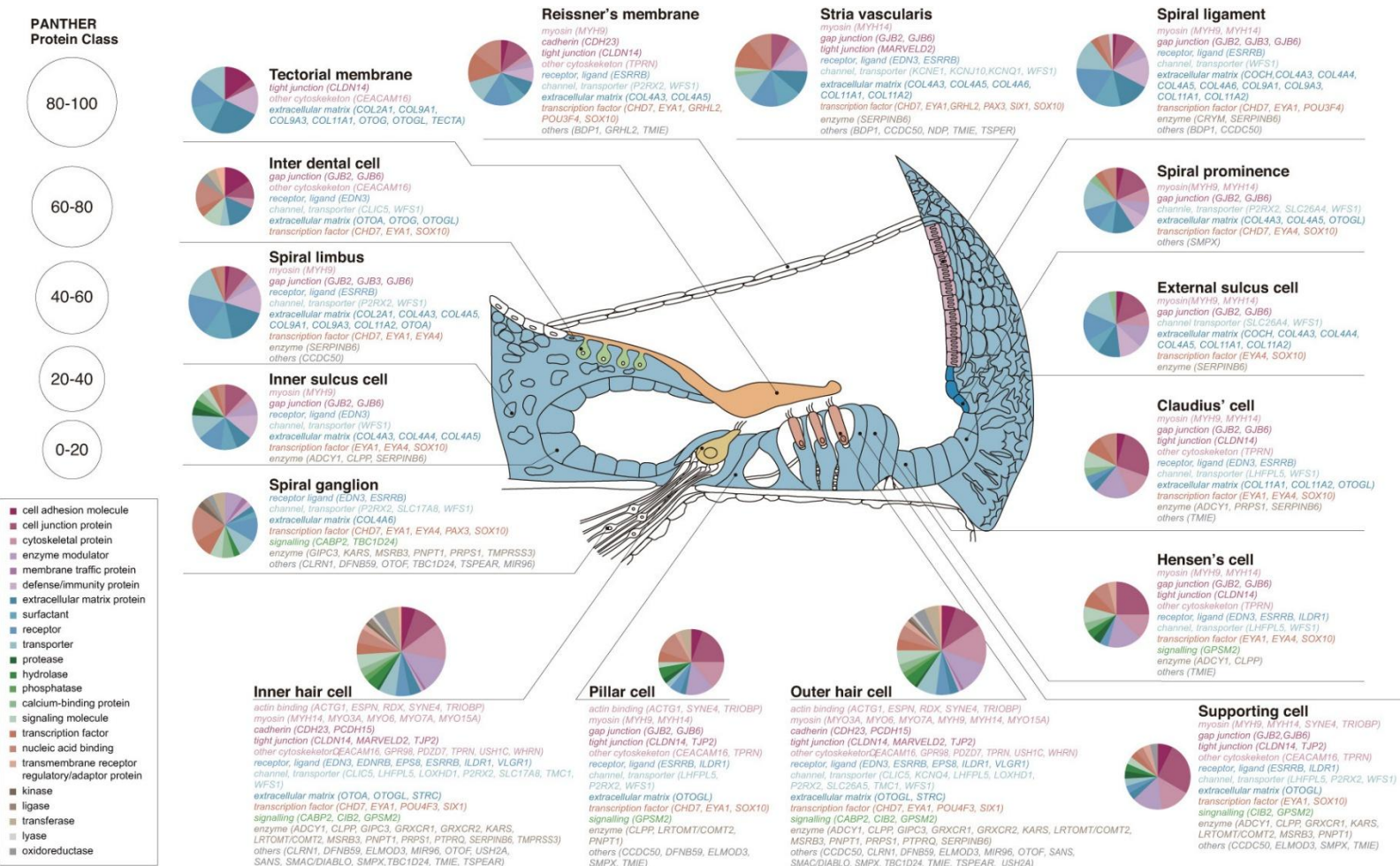


Figure 7 : Les gènes impliqués dans la surdité héréditaire.

Schéma illustrant les principaux gènes impliqués dans la surdité d'origine génétique, en précisant leur fonction générale ainsi que leur localisation au sein des structures cochléaires. Issu de Nishio et al⁵¹.

6.2. Presbyacousie

La presbyacousie est l'une des affections les plus fréquentes chez les personnes âgées. Elle se manifeste par une perte auditive progressive, irréversible, touchant principalement les hautes fréquences. Au cours du vieillissement, la MEC peut transmettre des signaux de sénescence aux cellules, tandis que ces dernières peuvent modifier à leur tour la composition et la structure de la MEC via leur sécrétome⁵².

Certaines études ont mis en évidence un amincissement de la MT, pouvant aller jusqu'à son détachement des cellules ciliées chez les individus atteints de presbyacousie⁵³. D'autres travaux ont révélé un épaississement et une calcification de la MB, rendant impossible ses mouvements en réponse aux stimulations sonores⁵⁴. Il a aussi été observé que l'expression des microARNs de la famille miR-29 augmentait dans la cochlée des souris âgées ; ces microARN pourraient inhiber l'expression de plusieurs gènes codant pour des composants majeurs de la MEC, tels que le collagène, l'élastine ou encore la fibrilline⁵⁵.

Avec l'avancée en âge, la MEC cochléaire est donc modifiée tant au niveau de sa composition que de ses propriétés, ce qui contribuerait à la dégénérescence des cellules qu'elle entoure. De plus, l'augmentation de l'inflammation au cours du vieillissement renforce ces altérations progressives de la MEC, ce qui pourrait jouer un rôle déterminant dans le développement de la presbyacousie.

6.3. Surdités liées à l'exposition sonore

Lors d'un traumatisme sonore, une série de perturbations a lieu au sein de la cochlée, pouvant entraîner des altérations transitoires ou permanentes de la fonction auditive. L'exposition à un bruit intense induit une déformation excessive des structures cochléaires qui peut conduire à un stress mécanique. Ce stress occasionne des dégâts structurels à la MT et aux stéréocils ainsi que des fuites ioniques. De plus, l'exposition excessive au bruit provoque une suractivation des neurones cochléaires, associée à l'excitotoxicité et au stress oxydatif. Les synapses sont les premières structures affectées par ces altérations physiologiques. Dans les cas modérés, ces dommages sont réversibles et la fonction auditive peut être restaurée dans les jours ou semaines qui suivent grâce à la réparation tissulaire. En revanche, une exposition plus sévère ou prolongée peut entraîner la mort des cellules ciliées et des neurones du ganglion spiral, ce qui engendre une perte auditive irréversible⁵⁶.

La MEC est fortement affectée par l'exposition sonore excessive. Une étude protéomique menée chez la souris a montré que de nombreux composants matriciels, en particulier les collagènes, subissent une dégradation rapide après une exposition au bruit, ce qui pourrait altérer la physiologie tissulaire⁵⁷. Par ailleurs, les cellules cochléaires réagissent au stress induit par le bruit

en modulant l'expression de protéines et de régulateurs clés de la MEC comme le collagène, la laminine, la ténascine C ou encore les métalloprotéinases, notamment MMP2 et MMP9^{58 59}. Le remodelage de la matrice est crucial à la réparation tissulaire et la restauration fonctionnelle. Toutefois il est probable que certains composants de la matrice puissent exacerber les lésions mécaniques et les altérations physiologiques liés au bruit.

7. Les métalloprotéinases : une famille multifonctionnelle

7.1. Structure et fonction

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) forment une superfamille d'endopeptidases dont l'activité catalytique est dépendante du zinc. Elles sont importantes dans la dégradation et le remodelage de la matrice extracellulaire, ce qui les rend essentielles pour de nombreux processus physiologiques comme la cicatrisation, l'inflammation, l'embryogenèse, la morphogenèse ou encore la plasticité synaptique. Les MMPs sont aussi connues pour leur régulation du comportement cellulaire en favorisant le clivage et la libération de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β ou le TNF- α , ce qui a tendance à exacerber la réponse inflammatoire en augmentant le recrutement leucocytaire. Elles peuvent également cliver la forme inactive des facteurs de croissance en leur forme active, comme le BDNF ou le TGF- β , et ainsi moduler la prolifération, la différenciation ou encore la migration cellulaire^{60 61}. Cependant, l'intérêt croissant porté à cette famille provient principalement du grand nombre de pathologies dans lesquelles ces enzymes sont impliquées. En effet, une surexpression des MMPs a été observée dans le cancer, les maladies vasculaires et diverses pathologies inflammatoires, soulignant l'importance d'une régulation spatio-temporelle fine de leur activité afin de préserver l'homéostasie de la MEC et des tissus^{62 63}.

Chez l'homme, on dénombre 23 MMPs classées en 6 catégories : les métalloprotéinases membranaires, les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines ainsi que l'épilysine (MMP28). Chacune des MMPs partage des caractéristiques communes, notamment la présence d'un domaine catalytique comprenant un atome de zinc, un pré-domaine servant à l'acheminement intracellulaire jusqu'à la membrane, un prodomaine qui cache le site actif, ainsi qu'un autre domaine structural C-terminal homologue à l'hémopexine, impliqué dans la spécificité des MMPs vis-à-vis de leurs substrats et leurs inhibiteurs. Certaines MMPs, comme les gélatinases MMP2 et MMP9, possèdent un motif fibronectine de type 2 permettant au domaine catalytique de se lier à la gélatine et au collagène (voir Figure 8)⁶¹.

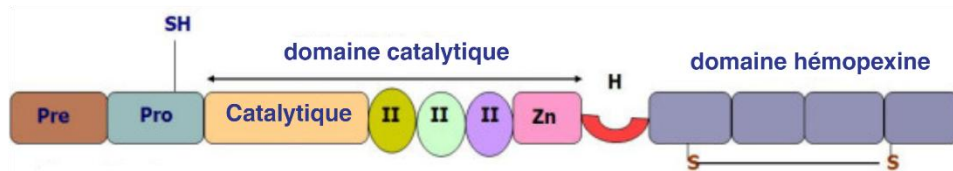


Figure 8 : Structure générale des gélatinases.

Les gélatinases présentent l'architecture classique des MMPs, comprenant un pré-domaine (Pre), un prodomaine (Pro), un domaine catalytique contenant un ion zinc (Zn), ainsi qu'un domaine hémopexine. Leur spécificité réside dans la présence de motifs de type fibronectine II au sein du domaine catalytique. Adapté de Cabral-Pacheco *et al* ⁶³.

La plupart des MMPs sont sécrétées dans la MEC par différents types cellulaires comme les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins, ou encore les cellules immunitaires. Une fois dans la matrice, le clivage par protéolytique du prodomaine permet l'activation des MMPs, les convertissant de leur forme zymogène en forme active. Ce clivage est réalisé par différentes sérine-protéases comme la trypsine, la plasmine, la thrombine et même d'autres MMPs⁶⁴.

7.2. Régulation des MMPs

Afin d'éviter des dommages tissulaires indésirables, il est essentiel de contrôler avec précision l'activité des protéases. Cette activité peut être régulée à différents niveaux : la transcription, la sécrétion, l'activation enzymatique ainsi que par l'action d'inhibiteurs comme les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs). Au niveau transcriptionnel, de nombreuses molécules comme les facteurs de croissance, les espèces réactives de l'oxygène, les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 ou le TNF α ou encore l'angiotensine régulent positivement la transcription des MMPs en augmentant la synthèse de facteurs de transcription spécifiques, comme SP-1 dans le cas des gélatinases^{65 66}. D'autres stimuli anti-inflammatoires tels que les corticoïdes et le TGF- β , inhibent leur transcription. Après leur synthèse, les MMPs peuvent subir différentes modifications post-traductionnelles qui modulent leur sécrétion, leur stabilité ou leur activité⁶⁵. Par exemple, la glycosylation, observée notamment pour MMP-9, contribue à sa stabilité et à sa bonne sécrétion⁶⁷. La phosphorylation, bien que plus rare, a été décrite pour MMP-2, où elle influence l'activité enzymatique ainsi que les interactions avec d'autres protéines⁶⁸.

Après sécrétion et clivage du zymogène dans la MEC, l'activation des MMPs s'accompagne d'une régulation stricte. L'un des mécanismes implique l'alpha-2-macroglobuline, qui piège et inhibe une grande variété de protéases, dont les MMPs, en formant des complexes non spécifiques qui sont ensuite éliminés de la MEC par endocytose⁶⁹. Un autre moyen de régulation majeur repose

sur l'action des TIMPs qui se lient au site catalytique des MMPs actives pour moduler leur activité enzymatique, soit en l'inhibant, soit en la stabilisant selon le contexte⁷⁰.

7.3. Les gélatinases et l'audition

La famille des gélatinases regroupe deux protéines, à savoir MMP2 et MMP9. La forme zymogène de MMP2 a un poids moléculaire de 72 kDa, tandis que celle de MMP9 atteint 92 kDa. Ce poids moléculaire plus élevé de MMP9 s'explique par des glycosylations post-traductionnelles au niveau du prodomaine. En plus de se ressembler sur le plan structural, les protéines ciblent des substrats communs comme le collagène (type, I, II, IV), la fibronectine, la laminine, l'élastine ou encore la gélatine, tous composants essentiels de la MEC.

Dans la cochlée, les gélatinases sont particulièrement exprimées dans les membranes basales, la strie vasculaire ainsi que le ganglion spiral. Des études préliminaires réalisées dans le labo ont aussi mis en évidence des concentrations élevées de MMP9 dans la capsule otique, tandis que MMP2 était surtout exprimé en bordure du ganglion spiral ainsi que dans les rampes vestibulaires et tympaniques. Cette distribution suggère un rôle important de ces deux protéines dans l'homéostasie et la plasticité tissulaire cochléaire. Leur surexpression a d'ailleurs été associée à certains troubles de l'audition, notamment en cas d'hyperhomocystéinémie. En effet, chez les souris déficientes pour le gène codant pour la cystathionine β -synthase, entraînant l'accumulation d'homocystéine, les deux gélatinases étaient surexprimées à la suite d'une altération de la méthylation des gènes⁷¹. La preuve que cette augmentation des MMPs pourrait être responsable des altérations morphologiques de la cochlée, telles qu'un détachement de la MT et un affinement de la strie vasculaire n'a toutefois pas été apportée dans ce modèle. Toutefois, il est possible que les capacités de remodelage des gélatinases puissent contribuer au développement de la surdité associée aux taux élevés d'homocystéine chez l'être humain⁷². Par ailleurs, les deux protéines sont aussi fortement régulées par l'inflammation, un processus physiopathologique bien décrit dans l'apparition de surdités liées à l'âge et aux traumatismes sonores. Une étude a d'ailleurs mis en évidence chez la souris, des changements d'expression de MMP2 et MMP9 à la suite d'un trauma, corrélés à des altérations de la barrière hémato-labyrinthique cochléaire, qui régule les échanges de sang entre le sang et les différents compartiments de l'oreille interne⁷³. Par ailleurs, une autre étude a identifié une surexpression de MMP9 dans le cortex auditif des rats âgées⁷⁴, tandis que des polymorphismes de MMP2 ont été associés à la survenue de la presbycusie chez l'Homme⁷⁵, suggérant un rôle potentiel de ces enzymes dans le vieillissement auditif.

Hypothèses, objectifs et stratégie

La MEC joue un rôle central dans l'organisation structurale et fonctionnelle de la cochlée. Elle assure un soutien mécanique et physiologique aux cellules otiques, confère les propriétés viscoélastiques essentielles à la propagation de l'onde sonore, contribue à la neurotransmission en stabilisant les synapses auditives et régule de nombreux processus de signalisation cellulaire. Le maintien de son intégrité est donc essentiel à la préservation de la fonction auditive, ce qui est souligné par le grand nombre de gènes du matrisome responsables de surdités chez l'Homme.

Parmi les enzymes de remodelage de la matrice, les gélatinases MMP2 et MMP9 pourraient constituer des acteurs clés de l'homéostasie cochléaire. Chez l'Homme, des polymorphismes du gène MMP2 ont d'ailleurs été associés à la presbyacousie. De plus, plusieurs études ont mis en évidence des modifications de leur expression otique, notamment avec l'âge ou après un stress acoustique, suggérant leur rôle potentiel dans les processus dégénératifs de l'audition. Ces métalloprotéinases pourraient donc être induites par l'inflammation cochléaire consécutive au vieillissement ou au bruit, et jouer un double rôle dans la physiopathologie auditive : soit en contribuant aux lésions cellulaires via leur capacité à dégrader de nombreux substrats tels que le collagène et la fibronectine, soit en participant à la réparation tissulaire.

Dans ce contexte, nous avons orienté notre étude sur MMP2 et MMP9, en considérant que ces enzymes pouvaient jouer un rôle majeur dans le remodelage matriciel consécutif à un trauma sonore ou au vieillissement. Dans un premier temps, nous avons évalué l'évolution de la fonction auditive de souris WT ou KO pour MMP2, via des enregistrements électrophysiologiques des potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral (ABRs) et des émissions des produits de distorsion otoacoustiques (DPOAEs). Nous avons ensuite étudié l'expression de MMP2 et MMP9 dans un contexte d'inflammation cochléaire. Des analyses par RT-qPCR et immunofluorescence ont été menées pour quantifier respectivement les taux de transcrits et de protéines dans l'organe de Corti, après traitement par une cytokine pro-inflammatoire en culture. Par ailleurs, nous avons analysé l'expression de MMP2 et MMP9 dans un modèle murin de perte auditive induite par traumatisme sonore.

Matériels et méthodes

1. Animaux

Les souris KO pour MMP2 ont été générées par l'équipe de Itoh⁷⁶, en remplaçant l'exon 1, ainsi que le promoteur du gène par une cassette néomycine, empêchant ainsi toute expression du gène (voir Figure 9).

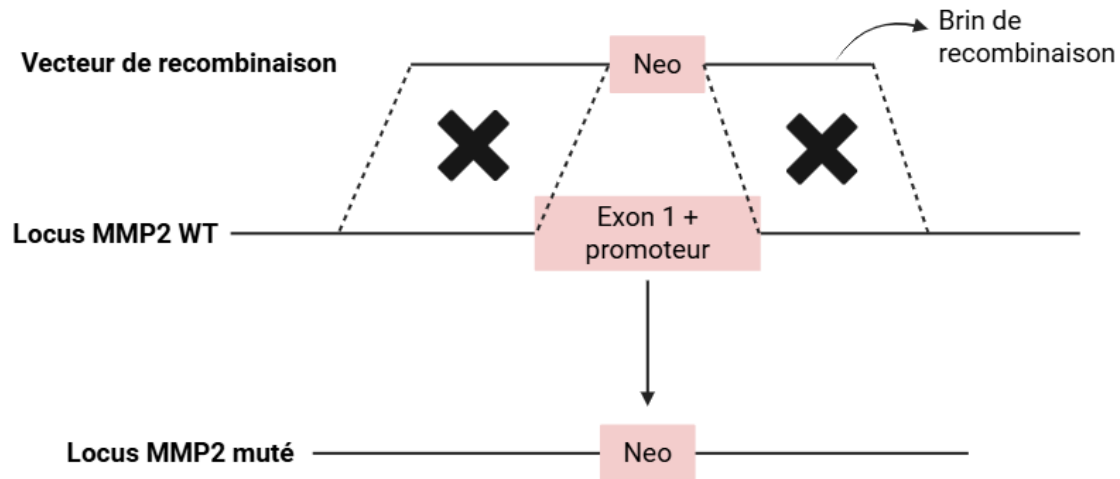


Figure 9 : Représentation schématique du vecteur de recombinaison et des loci MMP2 des souris WT et mutantes ;

Le vecteur de recombinaison a été conçu pour remplacer le promoteur et l'exon 1 du gène MMP2 par une cassette contenant le gène codant pour la néomycine.

2. Génotypage

Des fragments d'oreille de 3 mm sont prélevés lors du bouclage auriculaire des souris et digérés dans 300 µL de TENS (Tris 10 mM, EDTA 0,5 mM, 0,02% SDS, 20 mM NaCl) contenant 3 µL de protéinase K (V3021, 30 u/µL, PROMEGA). Les échantillons sont ensuite placés sous agitation pendant 1 heure (h) à 55 °C. Ensuite, 300 µL d'isopropanol 100% froid ont été ajoutés dans chaque tube qu'on centrifuge 10 minutes à 15000g à 4°C. Les surnageants sont éliminés et les culots d'ADN sont lavés dans 600 µL d'éthanol à 70%. Après mélange par inversion, les tubes sont centrifugés à nouveau 10 minutes dans les mêmes conditions que précédemment et le surnageant est éliminé. Les échantillons sont séchés pendant 5 à 10 minutes avant d'être resuspendus dans 300 µL d'eau Milli-Q. L'ADN obtenu est conservé à 4 °C.

La réaction PCR de génotypage est effectuée dans un volume total de 25 µL comprenant 5 µL de tampon de réaction 5X (M7848, PROMEGA), 0,5 µL de chaque amorce 10 µM (cf. Tableau 1), 0,5

μ L de dNTPs 10 mM, 1 μ L de $MgCl_2$ 25 mM (THERMOSCIENTIFIC) et 0,125 μ L de polymérase GoTAQ (M7848, 5 U/ μ L, PROMEGA) ainsi que 1,5 μ L d'ADN. Les tubes sont incubés dans le thermocycleur (SensoQuest Labcycler) selon le programme d'amplification présenté dans le tableau 1. Pour finir, les produits de PCR sont analysés sur gel d'agarose 1,5% après 30min de migration dans du TBE 1X (0658-4L, VWR CHEMICALS) à 135 volts.

Tableau 1 : Noms, séquences des amorces et programmes utilisés pour géotyper les souris *MMP2 KO*.

Noms des amorces	Séquences des amorces (5'-3')	Programme PCR
MMP2_gen_Fwd	GTGCTACTGCAGGATAAACTGATG	94°C - 3 min 30 cycles : 94°C – 10 sec 60°C – 30 sec 72°C – 60 sec 72°C – 5 min
MMP2_WT_gen_Rev	CCGGGACAGGAACGTACTGGGTTC	
MMP2_KO_gen_Rev	GCGCCTACCGGTGGATGTGGAATGTGTGCG	

3. Exposition sonore

Les souris C57Bl6 sauvages, âgées de 6 semaines, ont subi un traumatisme sonore consistant en une stimulation de 98 dB pendant 2 h à des fréquences comprises entre 8 et 16 kHz. Les oreilles internes de ces souris ont ensuite été prélevées à différents temps post-traumatiques : 2 h, 1, 3, 5 et 7 jours (J) après exposition sonore, afin de réaliser des immunofluorescences ou des RT-qPCR.

4. Préparation des cochlées adultes pour l'immunofluorescence

Les oreilles internes des souris traumatisées sont disséquées dans du PBS froid (L0615 500, BLOWEST). Elles sont d'abord extraites de la boîte crânienne et l'excédent de tissu entravant la fenêtre ronde et la fenêtre ovale est enlevé. À l'aide des forceps, un trou est réalisé dans la partie ventrale de la capsule otique, à l'apex de la cochlée. Les oreilles internes sont ensuite fixées à 4°C pendant 24 h sous agitation dans de la paraformaldéhyde 4% (PFA 4%, 158127, SIGMA). Après fixation, les oreilles internes subissent un traitement décalcifiant à l'EDTA 4% pendant un total de 6 jours sous agitation à 4°C avant d'être incubées dans les mêmes conditions dans des bains successifs de sucrose à 10%, 20%, puis enfin 30% (D (+) Saccharose 27478.365, VWR CHEMICALS) pour un total de 3 jours.

Les échantillons sont ensuite stockés à -80°C avant d'être enchâssés dans l'OCT (6502-B, Richard Allan Scientific Neg50 ; THERMOFISHER SCIENTIFIC). Les coupes de 16 μ m, dans l'axe du modiolus, sont ensuite réalisées au cryostat (Cryostar NX70, EPREDIA) au préalable refroidi à -20°C. Ces dernières sont faites à l'aide d'une lame (J1800AMNZ, EPREDIA) refroidie à -19°C et récupérées sur des lames porte-objets Superfrost™ (10356345, THERMOFISHER SCIENTIFIC) à

l'aide d'un anti-roll. Elles sont finalement séchées une nuit sous ventilation puis conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

5. Préparation des explants cochléaires de souris P3

Après sacrifice, les cochlées de souris au 3^{ème} jour postnatal (P3) sont disséquées dans du PBS supplémenté avec 30% de glucose sous hotte à flux laminaire en condition stérile. La tête est d'abord sectionnée du corps puis coupée en deux selon l'axe longitudinal, le cerveau est retiré et les oreilles internes sont extraites de la boîte crânienne. Les cochlées sont ensuite libérées de la capsule otique et les organes de Corti sont isolés du modiolus et de la strie vasculaire, afin d'être placés en culture sur inserts Millicell (PICM01250, MILLICELL) au sein d'une plaque 24 puits remplie de DMEM-GIN (DMEM (4,5 g/L D-glucose et L-glutamine), complété avec 1,5 g/L glucose, 5 µg/mL insuline, 1% N1 et 100 U/mL pénicilline). Les explants sont placés dans l'incubateur à 37°C avec 5% de CO₂ durant une nuit avant de subir un traitement pro-inflammatoire dans du DMEM GIN contenant 10 ng/mL d'IL-1β (575102, BIOLEGEND).

Pour l'immunofluorescence, les explants sont finalement fixés dans la PFA à 4% pendant 15min tous en même temps, 24 h, 8 h ou alors 4 h après le traitement à l'IL-1β. Trois lavages successifs de 5 min dans du PBS sont réalisés et la plaque recouverte de parafilm est placée à 4°C en attendant d'être utilisée.

Pour les RT-qPCR, les explants traités sont décrochés de la Millicell à l'aide de forceps après les mêmes durées de traitement (4, 8 ou 24 h). Les différents explants d'une même condition sont plongés dans 500 µL de Trizol (15596018, INVITROGEN) avant d'être rapidement congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C avant l'extraction d'ARN.

6. Immunofluorescence

Concernant les coupes de cochlées adultes, les échantillons sont tout d'abord rincés 3 fois pendant 5 minutes dans du PBS-triton 0,3% (PBST). Chaque lame est ensuite incubée pendant 1 h à température ambiante dans 200 µL de PBST supplémenté de donkey serum 10% (017-000-121, DS, JACKSON IMMUNO RESEARCH). La solution d'anticorps primaires (tableau 2) dilués dans du PBST contenant 5% de donkey serum est ajoutée et les lames incubent toute une nuit à 4°C. Les lames sont à nouveau rincées 3 fois 5 minutes dans du PBST et sont incubées 1 h dans le noir à température ambiante avec la solution d'anticorps secondaires Alexa Fluor™ (dilués au 1:1000) ainsi que le marqueur de noyaux cellulaires DAPI (D9542, SIGMA, dilué au 1:5000) dans du PBST-DS 5%. Les lames sont ensuite à nouveau rincées puis séchées et montées en déposant 4 gouttes de DAKO (S3023, AGILENT TECHNOLOGIES) et une lamelle couvre-objet de 20x60mm

(KNITTEL). Elles sont finalement séchées une nuit au ventilateur et placées à 4°C en attente de l'analyse au microscope confocal (Nikon A1R).

Concernant les explants de culture, ces derniers sont immunomarqués selon la procédure décrite ci-dessus. Chaque étape est réalisée directement dans une plaque 24 puits, où 250 µL de chaque solution sont déposés à l'intérieur et à l'extérieur de l'insert. Après le dernier lavage, la membrane de la Millicell sur laquelle sont déposés les explants est délicatement décrochée pour être placée, explants vers le haut sur une lame porte-objet. Une goutte de DAKO est ajoutée sur les tissus qui sont recouverts d'une lamelle couvre objet de 22 x 22 mm. Les lames sont également séchées tout une nuit à température ambiante sous ventilation et placées à 4°C en attendant l'analyse.

Tableau 2 : *Anticorps primaires utilisés lors de l'immunomarquage*

Type d'anticorps	Cibles	Références	Espèces d'origine	Dilutions	Périodes d'incubation
Anticorps primaires	MMP2	SantaCruz (sc-13595)	Mouse	1/100	Une nuit à 4°C
	MMP9	Sigma Aldrich (M9570)	Goat	1/100	Une nuit à 4°C
	IBA-1	FUJIFILM Wako (019-19741)	Rabbit	1/1000	Une nuit à 4°C

7. Analyse des images

Les immunofluorescences réalisées sont imagées sur le microscope confocal Nikon A1R. Les cochlées de souris traumatisées sont d'abord analysées à faible grossissement (objectif 10x), puis des images sont prises au grossissement 40x en ciblant l'organe de Corti, la strie vasculaire et le ganglion spiral. Les paramètres d'acquisition du microscope sont identiques pour toutes les conditions expérimentales analysées mais varient en fonction de l'objectif. Les paramètres sont calibrés à partir d'une coupe contrôle (non traumatisée). Pour chaque champ, des images sont prises à plusieurs plans focaux (le long de l'axe z), espacés de 1,2 à 3 µm en fonction de l'objectif et le post-traitement est réalisé sur le logiciel FIJI. Pour les coupes 10x, l'image résultante est une moyenne de l'intensité de fluorescence de tous les plans alors que pour les coupes 40x, c'est une projection sommée des différents plans, et ce pour chaque canal individuel.

Concernant les explants, c'est la même chose mais ici les zooms au 40x sont focalisés sur la zone bordant l'épithélium des cellules ciliées. Les plans focaux sont ici espacés de 1,5µm et lors du post traitement, que ce soit pour les coupes 10x ou 40x, l'image résultante est une projection sommée des différents plans pour chaque canal.

8. Extraction d'ARN et RT-qPCR

Les cochlées adultes ainsi que les explants sont tout d'abord broyés sous hotte dans 500 μ L de Trizol à l'aide d'un pilon électrique (47747-366, VWR CHEMICALS) pendant 2 minutes. Les échantillons reposent ensuite pendant 3 minutes à température ambiante avant que 100 μ L de chloroforme (Nr. CAS 67-66-3, ROTH) ne soient rajoutés dans chacun des tubes. Les tubes sont secoués vigoureusement pendant 15 secondes avant d'être centrifugés 15 minutes à 12000 g à 4°C. La phase aqueuse supérieure est récupérée et transférée dans un autre tube dans lequel on ajoute 500 μ L d'isopropanol (20842.323, VWR CHEMICALS). Après plusieurs inversions, ils sont à nouveau centrifugés à 12000 g à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant est retiré et le culot d'acides nucléiques est lavé avec 1 mL d'éthanol à 75% (20821.310, VWR CHEMICALS) et une centrifugation à 7500 g à 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant est à nouveau éliminé, les échantillons sont séchés à l'air libre pendant 5 à 10 minutes et sont resuspendus dans 40 μ L d'eau RNase-free. Ils sont incubés 10 minutes à 55°C puis 5 μ L de DNase I (1 U/ μ L) et de tampon 10X (EN0521, FISHER) sont rajoutés dans un volume final de 50 μ L avant d'être à nouveau incubés pendant 30 minutes à 37°C. Cinq μ L d'EDTA 0.55 M sont finalement rajoutés pour une incubation de 10 minutes à 65°C, puis les ARNs extraits sont dosés au Nanodrop (Nanodrop 2000, THERMO SCIENTIFIC) et stockés à -80°C en attendant la rétrotranscription.

Pour la RT, la réaction est effectuée avec 350 à 500 ng d'ARN par échantillon et le kit de rétrotranscription de ThermoFisher (K1622). Les ARN sont d'abord mélangés avec 1 μ L d'amorces aléatoires (100 μ M) et la solution est complétée par de l'eau pour arriver à un volume de 12 μ L. Les échantillons sont ensuite incubés 5 minutes à 65°C avant que ne soient ajoutés 4 μ L de tampon de réaction 10X, 1 μ L de Ribolock (20 U/ μ L), 2 μ L de dNTP 10 mM et 1 μ L de RT (200 U/ μ L) pour un volume réactionnel total de 20 μ L. Les échantillons incubent ensuite 5 minutes à 25°C puis 1 h à 42°C et enfin 5 minutes à 72°C avant d'être conservés sur glace si la qPCR est réalisée immédiatement, ou alors les ADNc seront stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Pour la qPCR, 4 μ L d'ADNc dilué au 1:20 sont mélangés à 6 μ L de mix contenant 1 μ L de chaque amorce à 3 μ M, spécifiques des gènes que l'on souhaite amplifier (voir Tableau 3) ainsi que 5 μ L de réactif fluorescent SYBR Green Super Mix (A60002, PROMEGA). Chaque échantillon est réalisé en triplicat et les différentes étapes de réaction, présentées dans le tableau 4, s'effectuent dans un Lightcycler 480 (ROCHE) au sein d'une plaque 384 puits. La quantification d'ADN est relative à une gamme composée de dilutions sériées du mélange de tous les échantillons testés. Pour établir cette gamme, 10 μ L de chacun des échantillons rétro-transcrits sont déposés dans un tube et le tout est dilué 20 fois pour constituer le point de gamme le plus concentré (concentration arbitraire de 1). Les autres échantillons de la gamme sont réalisés par dilution en série à partir de

cette solution mère (1:2, 1:10, 1:20, 1:100). Pour chaque échantillon, la concentration relative à la gamme est déterminée pour chaque gène et la moyenne des triplicats techniques est normalisée sur celle obtenue pour les différents gènes de ménage (GAPDH, β -Actin, 36B4).

Tableau 3 : Amorces utilisées pour la qPCR

Gène	Séquence cible	Nom
36B4	5'-ATGGGTACAAGCGCGTCCTG-3'	m36B4qFex6
	5'-GCCTTGACCTTTTCAGTAAG-3'	m36B4qRex6_7
B-Actin	5'-CACTGTCGAGTCGCGTCC-3'	mActb
	5'-TCATCCATGGCGAACTGGTG-3'	mActb
GAPDH	5'-TTGGCATTGTGGAAGGGCTCA-3'	mGAPDHqFex4
	5'-GCCATCACGCCACAGCTTTC-3'	mGAPDHqRex5
MMP2	5'-GGCTGGAACACTCTCAGGAC-3'	mMMP2qFex8
	5'-GTCAGTATCAGCATCGGGGG-3'	mMMP2qRex9
MMP9	5'-CCGACTTTTGTGGTCTTCCC-3'	mMMP9qFex1
	5'-CGGTACAAGTATGCCTCTGC-3'	mMMP9qRex1_2
IL-6	5'-GGATACTACTCCCAACAGACC-3'	mIL6qFex2
	5'-TTCTGCAAGTGCATCATCGT-3'	mIL6qRex3
IL-1 β	5'-CCTTCCAGGATGAGGACATGA-3'	mIL-1betaqFex4_2
	5'-TGAGTCACAGAGGATGGGCTC-3'	mIL-1betaqRex5_2

Tableau 4 : Étapes de la qPCR

Étape	Température	Durée
Préincubation	95°C	10min
Amplification	95°C	10sec
	60°C	45sec
Courbe de fusion	95°C	15sec
	60°C	30sec
	97°C	+0.11°C/seconde (5 acquisitions / seconde)
Refroidissement	40°C	30sec

9. Potentiels évoqués auditifs (ABRs)

Les ABRs sont enregistrés sur des souris adultes WT ou KO pour MMP2 à différents âges, allant de 8 à 40 semaines. Les souris sont d'abord pesées et en fonction de leur poids, une solution de 100 mg/mL de ketamidor (100 mg/kg) (804131, ECUPHAR) supplémenté en rompun 2% (20 mg/kg) (BE-V041815, BAYER) leur est injectée en intrapéritonéale pour l'anesthésie. Les souris sont ensuite laissées 5 minutes dans leur cage le temps que l'anesthésie fasse effet puis sont placées sur un coussin chauffé (39DP, DELTAPHASE), à l'intérieur d'une chambre isolée électriquement et acoustiquement à 10 cm d'un haut-parleur. Ce dernier délivre des stimulations sonores de 0 à 90 dB dans une gamme de fréquences allant de 4000 à 48000 Hz. Les réponses à ces stimulations sonores sont enregistrées sous la forme de potentiels évoqués, où chaque pic représente un relais dans la voie auditive allant du nerf cochléaire jusqu'aux centres auditifs du tronc cérébral. L'enregistrement se fait grâce à trois électrodes, l'électrode de référence est placée à la base de l'oreille du côté qu'on souhaite enregistrer, l'électrode d'enregistrement est placée au sommet du crâne au niveau du vertex et la prise de terre est placée à l'oreille controlatérale. Des stimulations sonores sont effectuées par sons de fréquence pure (pure tones) aux fréquences suivantes : 4, 8, 16, 24, 32 et 48 kHz, à des intensités croissantes.

La représentation et l'analyse des courbes de potentiels évoqués se font sur le logiciel BioSigRZ. Le seuil auditif est déterminé comme étant la plus petite intensité de stimulation sonore à laquelle on observe une réponse stéréotypée, laquelle est caractérisée par cinq pics représentant respectivement le nerf cochléaire, les noyaux olivaires inférieurs et supérieurs, le lemniscus médial et le colliculus inférieur. À 8 semaines, l'amplitude et la latence du premier pic ont également été analysés. La première est définie comme la différence entre le sommet du pic I et la vallée suivante. La latence est quant à elle le temps entre le début de l'enregistrement et le sommet du premier pic. Les curseurs étaient placés manuellement à l'aide du logiciel BioSigRZ, et les fichiers CSV étaient ensuite exportés pour une analyse complémentaire dans le logiciel R.

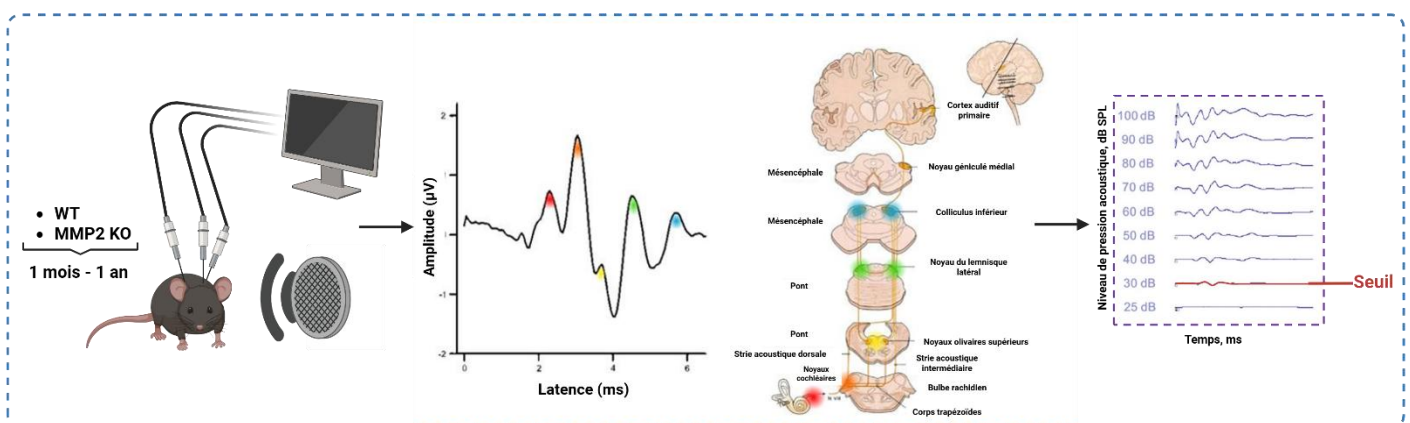


Figure 10 : Description des ABRs et de leur fonctionnement général.

Les souris sont stimulées par des sons d'intensités croissantes et la réponse électrique est enregistrée sous la forme d'une courbe composée de 5 pics représentant différents relais au sein de la voie auditive. En pure tone ou en click, les courbes sont compilées pour chaque intensité de stimulation et le seuil auditif de l'animal correspond à la plus petite intensité à laquelle on observe cette réponse stéréotypée.

10. Emissions des produits de distorsion otoacoustiques (DPOAEs)

Les DPOAEs permettent d'analyser l'activité des cellules ciliées externes par l'enregistrement du son résultant de leur contraction à la suite d'une stimulation sonore (produit de distorsion acoustique). Pour ce faire, les souris sont disposées sur un coussin chauffé et une sonde est placée dans le canal de l'oreille externe. Celle-ci est capable de détecter des sons de faibles intensités grâce à un microphone et contient également deux haut-parleurs délivrant deux sons de fréquences différentes, f_1 et f_2 . Les fréquences délivrées par les haut-parleurs sont fixées à des couples de fréquences allant de 4 à 30 kHz, balayant ainsi toute la cochlée. Les produits de distorsion sont enregistrés pour des stimulations sonores allant de 0 à 90 dB. L'amplitude des DPOAEs est extraite pour chaque fréquence et chaque intensité de stimulation via le logiciel R. Le tout est ensuite présenté sous forme de graphiques, où l'intensité en dB du DPOAE reflète le son produit par les cellules ciliées externes lors de leur contraction.

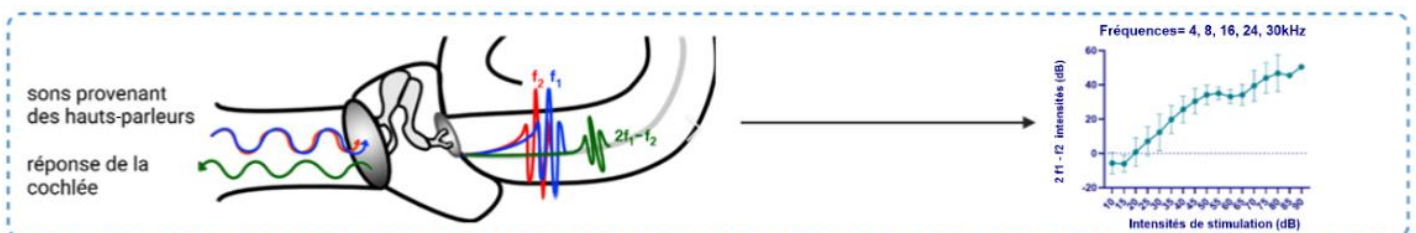


Figure 11 : Description des DPOAE et de leur fonctionnement général.

Deux sons de fréquences distinctes sont envoyés à la cochlée qui, en réponse, émet un son résultant de la contraction des cellules ciliées externes. Pour chaque fréquence et intensité de stimulation, l'amplitude des produits de distorsion traduit l'intensité de la réponse cochléaire en dB qui est représentée graphiquement.

11. Analyses statistiques

Les analyses statistiques concernant les seuils d'ABR ainsi que les RT-qPCR ont été réalisées sur GraphPad Prism (version 8.0.2), tandis que celles concernant la latence du pic 1 d'ABR, son amplitude ainsi que l'amplitude du produit de distorsion ont été réalisées sur le logiciel R. Des tests paramétriques ou non-paramétriques ont été effectués en fonction des résultats du test de normalité. Les détails concernant les tests statistiques individuels et les comparaisons multiples sont précisés dans les légendes des figures concernées. * = $p\text{val} < 0,05$, ** = $p\text{val} < 0,01$, *** = $p\text{val} < 0,001$ & **** = $p\text{val} < 0,0001$.

Résultats

1. Analyse de la fonction auditive au cours du vieillissement chez des souris WT ou KO pour MMP2

Chez l'Homme, des polymorphismes du gène MMP2 ont été associés à la presbycousie, c'est-à-dire à la perte auditive liée à l'âge. Cette gélatinase pourrait donc jouer un rôle non négligeable dans l'homéostasie cochléaire au cours du vieillissement. Le premier objectif de mon mémoire était donc d'analyser le rôle de MMP2 dans la fonction auditive murine au cours du temps. Pour ce faire, l'audition de souris sauvages ou invalidées pour le gène MMP2 a été comparée à différents âges.

Nous avons tout d'abord réalisé une analyse des potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral ou ABR (Auditory Brainstem Responses), chez des souris WT ou KO pour MMP2, âgées de 8 à 40 semaines (Figure 12A). Cette technique permet de mesurer les signaux électriques générés au niveau du tronc cérébral, en réponse à des stimuli sonores d'intensité croissante (0 à 90 dB avec un pas de 5 dB). Le seuil auditif a été déterminé pour chaque souris et correspond à l'intensité minimale de son pour laquelle les 5 pics caractéristiques de l'ABR restent identifiables (cf. Mat&Meth paragraphe 9). Les analyses réalisées en « pure tone » nous ont permis de déterminer le seuil auditif des animaux pour des sons de fréquences précises, dans une gamme allant de 4 à 48 kHz (Figure 12B).

En premier lieu, aucune différence significative de seuil n'a été observée à 8 semaines entre les WT et les KO (Figure 12B). La cochlée étant fonctionnellement mature dès P14, l'expérience semble soutenir que MMP2 n'est pas essentielle à son développement. Ensuite, un déclin progressif de l'audition est observé au cours du temps chez les WT, touchant d'abord les hautes fréquences avant de s'étendre aux basses fréquences. En effet, on remarque une élévation des seuils auditifs, dépassant 85 dB pour 32 et 48 kHz dès la 24^{ème} semaine. À partir de la 32^{ème} semaine, le seuil auditif dépasse également 85 dB pour les stimulations à 24 kHz. Cette élévation s'étend par la suite à 16 kHz à la 40^{ème} semaine, indiquant une surdité quasi-totale chez ces animaux à ce stade

Chez les souris KO, un déclin de la fonction auditive est également observé au cours du temps, bien qu'il semble survenir plus tardivement (Figure 12B). En effet, à 12 semaines, les KO présentent un seuil significativement plus faible que les WT à 48 kHz (69 dB versus 95 dB). Par ailleurs, à partir de la 24^{ème} semaine, une différence statistiquement significative apparaît aux fréquences de 24 et 32 kHz, où les KO présentent à nouveau une sensibilité auditive

Afin de savoir si des différences plus subtiles de la fonction auditive pourraient déjà exister chez les souris KO âgées de 8 semaines, nous avons mesuré l'amplitude et la latence des potentiels évoqués pour des intensités sonores élevées (de 65 à 90dB). En effet, une variation d'amplitude du 1^{er} pic d'ABR, qui reflète l'activité du nerf cochléaire, peut être détectée avant toute variation significative du seuil auditif. Une diminution de l'amplitude de ce pic traduit une diminution de la sensibilité acoustique et est généralement associée à une synaptopathie ou à une perte des fibres du nerf auditif innervant les cellules ciliées. À l'inverse, la latence du 1^{er} pic reflète le temps nécessaire à la propagation de l'information sonore, et une augmentation peut être liée à des altérations de la myéline ralentissant la conduction de l'influx nerveux. Les analyses de l'amplitude et de la latence à 8 semaines n'ont révélé aucune différence significative entre les WT et les KO, confirmant ainsi une fonction cochléaire équivalente à ce stade (Figure 13).

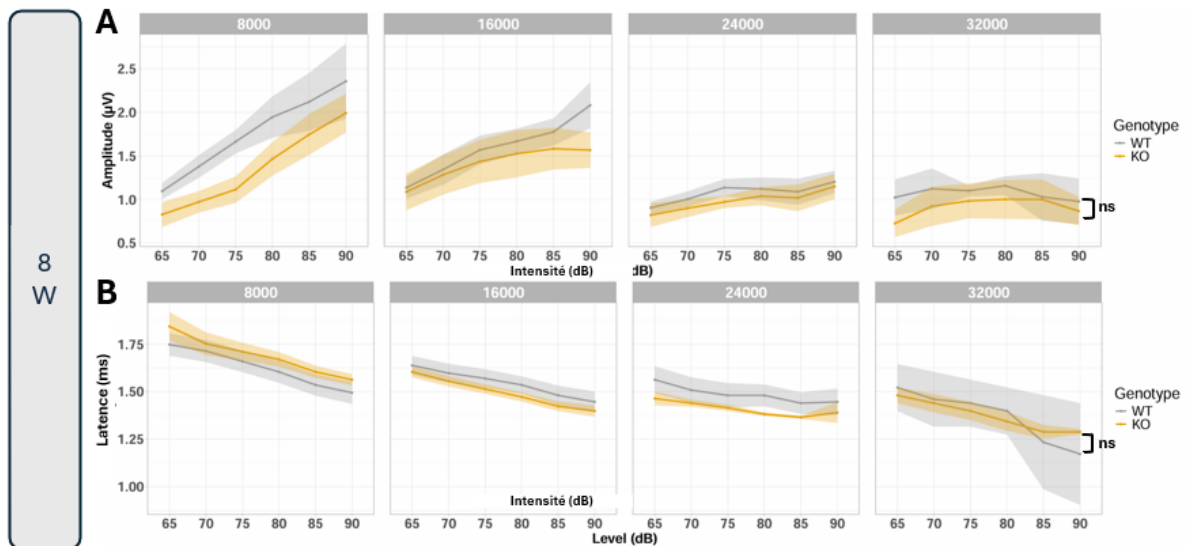


Figure 13 : Analyse de la fonction auditive chez des souris WT ou KO pour MMP2, activité de nerf cochléaire à 8 semaines.

A-B. Amplitudes en μV (A) et latences en ms (B) du pic 1 d'ABR (en μV) pour des intensités de stimulation allant de 65 à 90dB et pour différentes fréquences (8 à 32 kHz) entre les souris WT et KO pour MMP2 à 8 semaines. Chaque valeur d'amplitude est représentée comme étant la moyenne \pm SEM ($n=6/5$). Une analyse Anova à 2 facteurs avec valeurs répétées a été effectuée comme test statistique.

Enfin, afin de compléter l'analyse de la fonction auditive, nous avons cherché à mieux comprendre les mécanismes de protection contre la presbyacousie dont les souris KO semblent bénéficier. Les seuils auditifs étant plus bas chez ces derniers à certaines fréquences à différents stades du vieillissement (24 et 32 semaines à 24 et 32 kHz notamment), la survie ou l'activité des

CCs pourrait être meilleure que chez les WT. En effet, les cellules ciliées dégénèrent progressivement au cours du vieillissement, avec perte des CCEs avant les CCI. Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé les produits de distorsion otoacoustiques (DPOAEs) à 32 semaines.

À la suite d'une stimulation sonore, la dépolarisation des CCEs induit une contraction cellulaire destinée à amplifier les mouvements des membranes cochléaires auxquelles elles sont attachées, facilitant ainsi la détection des ondes sonores par les CCI. Cette activité contractile des CCEs émet un faible son mesurable dans le conduit auditif externe. En mesurant l'amplitude de ce produit de distorsion (DP), il est donc possible d'évaluer l'électromotilité des CCEs et le processus d'amplification cochléaire. À 32 semaines, on constate tout d'abord que les amplitudes des DPs sont faibles pour les hautes fréquences (24 et 32 kHz), ce qui est en accord avec leur seuil auditif ABR élevé pour les sons aigus (Figure 14). Cependant, alors que la fonction auditive est meilleure chez les KO pour ces hautes fréquences, aucune différence d'activité des CCEs n'a pu être observée. En revanche, nos analyses indiquent des différences légères mais significatives pour des sons de 8 et 16 kHz, alors même qu'aucune différence de seuil n'a été observée.

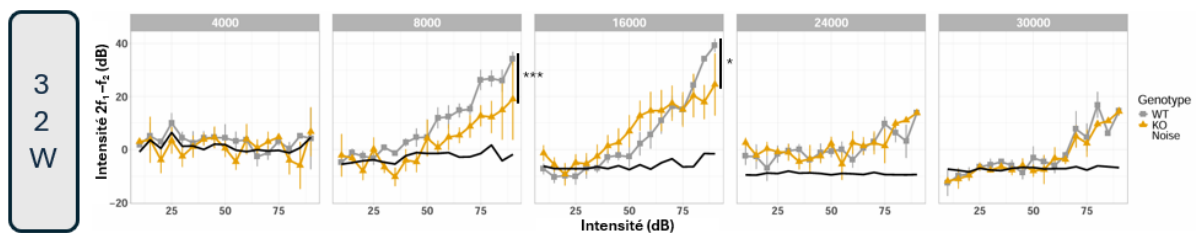


Figure 14 : Analyse de la fonction auditive chez des souris WT ou KO pour MMP2, amplitude des produits de distorsion otacoustiques (DPOAE) à 8 et 32 semaines.

Amplitudes des DPOAEs émis pour différentes intensités de stimulation sonore (0 à 90 dB), à différentes fréquences (4, 8, 16, 24 et 30 kHz) chez les souris WT et KO pour MMP2 âgées de 32 semaines (B). Chaque valeur d'amplitude (en dB) est représentée comme étant la moyenne \pm SEM ($n=6/5$). Une analyse Anova à 2 facteurs avec valeurs répétées a été effectuée comme test statistique. * = $p\text{-val} < 0,05$, ** = $p\text{-val} < 0,01$, *** = $p\text{-val} < 0,001$ & **** = $p\text{-val} < 0,0001$.

En conclusion, nos résultats indiquent que la gélatinase MMP2 ne semble pas essentielle au développement cochléaire et à l'établissement de la fonction auditive car à 8 semaines, les seuils auditifs et l'activité du nerf cochléaire sont similaires entre les animaux WT et KO. En revanche, cette métalloprotéinase pourrait contribuer aux pertes auditives liées à l'âge puisque

l'invalidation de MMP2 améliore significativement les seuils d'audition pour les sons de haute fréquence de manière précoce, dès 12 semaines. Malgré un déclin auditif inévitable au cours du vieillissement, avec des pertes fonctionnelles qui s'étendent progressivement vers les fréquences les plus basses, l'absence de MMP2 permet de retarder significativement la progression et la sévérité de la presbycusie. En effet, l'amélioration des seuils auditifs est maintenue jusqu'à 40 semaines, terme de notre protocole expérimental. Cette amélioration de l'audition ne semble pas résulter d'une meilleure préservation des cellules ciliées externes, l'amplitude des DPOAEs n'étant pas augmentée aux fréquences concernées. Des expériences supplémentaires seront donc nécessaires pour déterminer par quels mécanismes l'absence de remodelage matriciel médié par MMP2 pourrait contribuer à cette protection.

2. Étude de l'inflammation cochléaire et de son impact sur l'expression des gélatinases

2.1. Analyse de l'expression des gélatinases après traitement par IL-1 β ex vivo

Plusieurs études ont mis en évidence l'inflammation comme un régulateur majeur de l'expression des gélatinases^{77 78 79}. Selon le compartiment affecté, l'origine ou la durée de l'inflammation, l'expression et l'activité des MMPs peuvent être modulées à la hausse ou à la baisse. Dans cette partie, l'objectif était d'analyser l'impact d'un traitement pro-inflammatoire en culture, sur l'expression des gélatinases présentes au sein de l'OC.

Pour ce faire, les OC ont d'abord été prélevés de cochlées issues de souris âgées de 3 jours postnataux (P3), puis placés en culture avant de subir un traitement par la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β pendant 4, 8 ou 24 h. Les taux de transcrits MMP2 et MMP9 ont été déterminés par RT-qPCR pour deux expériences indépendantes, chacune réalisée avec un pool de 5 explants par condition. On constate dans la première expérience (Figure 15B), que le traitement a provoqué une augmentation rapide et transitoire de la transcription d'IL-6, confirmant qu'IL-1 β a induit une forte réponse inflammatoire dans l'organe de Corti. Dans ces conditions, MMP2 ne semble pas impacté puisque sa transcription reste stable dans les différentes conditions. MMP9 en revanche voit sa transcription augmentée jusqu'à 30 fois, de manière progressive au cours du traitement. Dans la deuxième expérience présentée à la figure 15C, le traitement semble avoir induit moins d'inflammation au vu des taux d'IL-6 qui sont largement inférieurs à ceux obtenus la première fois. Les observations restent toutefois les mêmes pour MMP2 dont l'expression reste inchangée au cours des 24 h de traitement, ainsi que pour MMP9 dont la transcription est

augmentée par l'IL-1 β , mais dans une moindre mesure en comparaison à la première série. En résumé, ces résultats suggèrent que seul MMP9 est induit dans l'OC après traitement à l'IL-1 β .

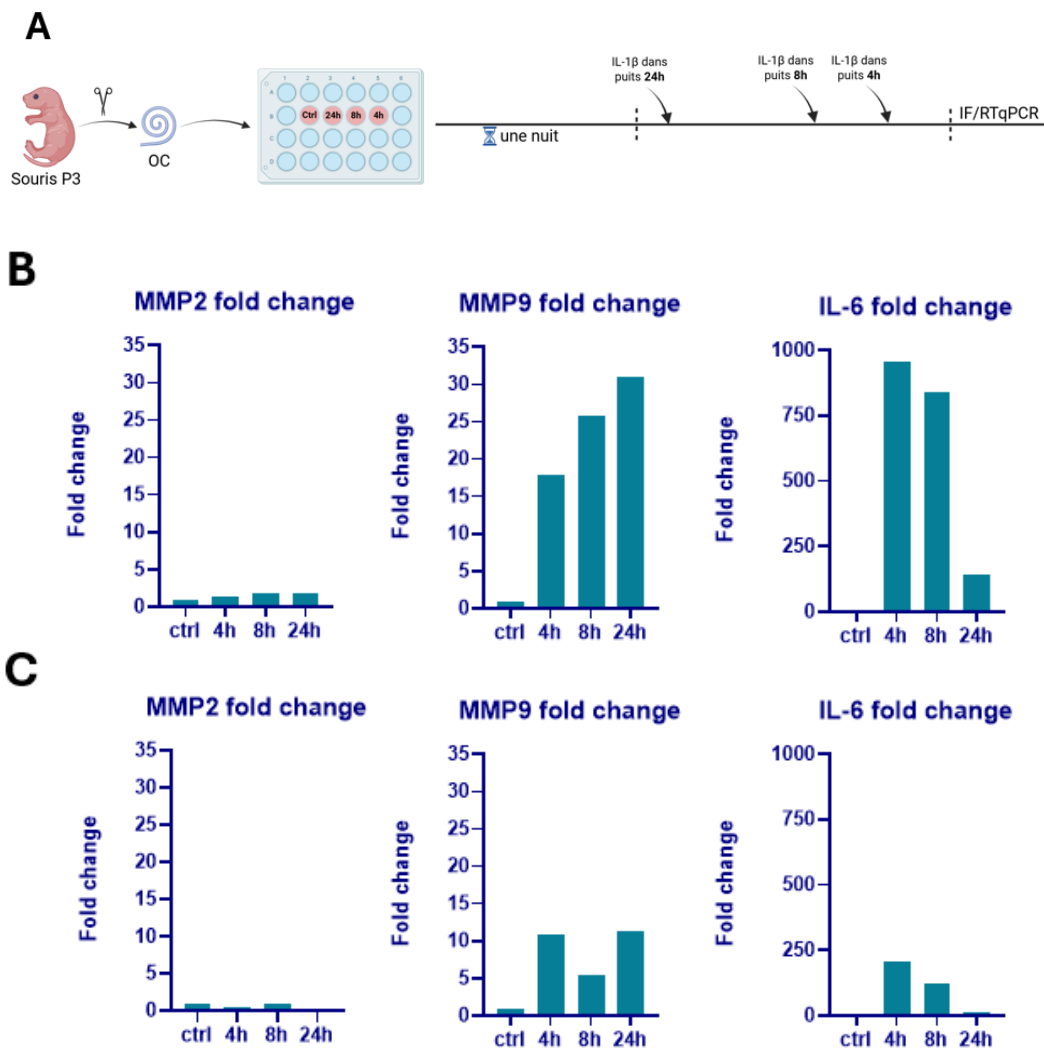


Figure 15 : Etude des niveaux de transcrits MMP2 et MMP9 par RT-qPCR sur les explants traités par IL-1 β .

A. Schéma expérimental : Les organes de Corti de souriceaux âgés de 3 jours (P3) ont été disséqués et placés sur des inserts de culture (5 explants par puits). Au cours des 36 h de culture, ils ont été traités par l'IL-1 β durant 0, 4, 8 ou 24 h et les ARNs ont été extraits.

B-C. Taux relatifs des transcrits MMP2, MMP9 et IL6 mesurés par RT-qPCR pour 2 expériences indépendantes. Pour chaque condition (n=1, pool de 5 explants), les résultats ont été normalisés sur la moyenne des gènes de référence (GAPDH, β -actine et 36B4), et rapportés à la valeur obtenue pour la condition contrôle (non stimulé).

Afin de vérifier si l'augmentation de la transcription de MMP9 était corrélée avec une augmentation au niveau protéique, des immunofluorescences ont également été réalisées sur chaque condition. L'efficacité du traitement à l'IL-1 β a tout d'abord été contrôlée par un marquage avec l'anticorps anti-IBA-1, un marqueur de cellules microgliales, les macrophages résidents du tissu cochléaire. On constate que dans la condition contrôle, la microglie est déjà très présente sur toute la longueur de l'OC qui reprend ici sa forme naturelle de spirale allant de la base à l'apex (Figure 16). Après 8h de traitement, comme observé dans l'encart, les cellules microgliales semblent adopter une morphologie plus amiboïde, caractéristique de leur activation. De plus, le nombre de cellules semble augmenter après 24 h, dans les zones plus profondes de l'OC. Concernant MMP9, la protéine semble s'accumuler dans la zone périphérique de l'OC, correspondant à la région des CCs (Figure 16).

En conclusion, ces expériences suggèrent que la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β augmente l'expression de MMP9 au sein de l'organe de Corti. Cette gélatinase est induite au niveau transcriptionnel par un traitement pro-inflammatoire en culture et la protéine s'accumulerait dans la région des cellules ciliées. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces observations et l'intensité de fluorescence pourrait être mesurée et comparée dans les différentes conditions.

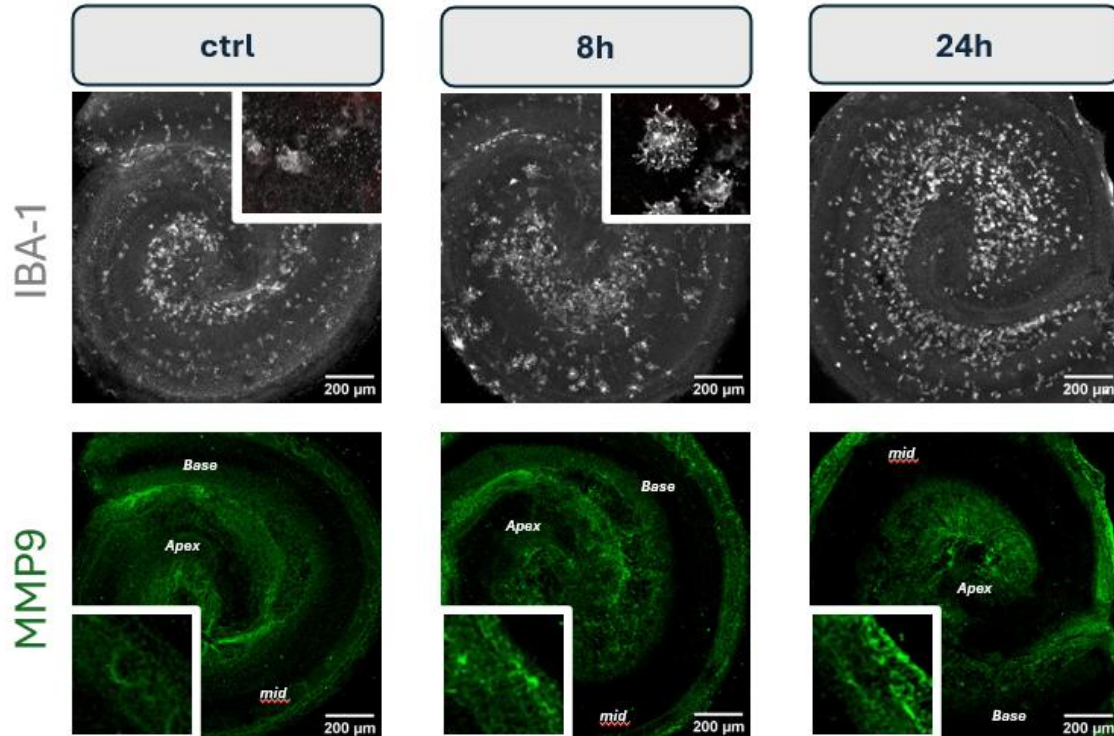


Figure 16 : Etude des niveaux protéiques de MMP9 par IF sur explants traités par IL1b.

Immunomarquage pour IBA-1 et MMP9 sur des explants cochléaires de souris P3 traités 0 (ctrl), 8 h ou 24 h par IL-1 β . Les images ont été réalisées à l'objectif 10x et les encarts représentent des agrandissements réalisés dans le tour médian.

2.2. Analyse de l'expression des MMPs après un traumatisme sonore

Comme mentionné dans l'introduction, l'exposition à des sons de forte intensité est étroitement associée à une inflammation cochléaire. Par ailleurs, une étude publiée en 2017 suggère que la surexposition sonore augmente l'expression de MMP2 et MMP9, qui s'accumuleraient dans la strie vasculaire des animaux traumatisés⁷³. Nous avons donc entrepris de valider ces observations dans un modèle de trauma acoustique récemment développé au laboratoire. Plus précisément, des souris sauvages, âgées de 6 semaines, ont été exposées pendant 2 heures à un bruit blanc d'une intensité de 98 dB, et les cochlées ont été récoltées pour des analyses par RT-qPCR et par immunohistochimie à différents temps post-exposition (2 heures ou 1, 3 et 7 jours) (Figure 17A).

2.2.1. Effet du traumatisme sonore sur l'activation microgliale

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'inflammation induite dans la cochlée après notre protocole de trauma sonore. Pour ce faire, nous avons effectué des immunomarquages d'IBA-1 pour visualiser les cellules microgliales (Figure 17B). Dans la condition contrôle, on remarque une quantité importante de microglie au sein de l'axe central du modiolus, où les axones des neurones auditifs se regroupent pour former le nerf cochléaire. Dans les agrandissements réalisés dans le ganglion et dans la strie, on ne remarque que peu de cellules IBA-1 positives alors qu'elles sont clairement présentes aux abords de l'OC. Un jour après le trauma, le marquage IBA-1 est accentué au pourtour des scalas, probablement dans les capillaires sanguins voisins. Ce marquage pourrait donc refléter la présence de macrophages issus de la circulation, puisque ces derniers expriment également IBA-1. Dans les images réalisées à plus fort grossissement, on observe une légère augmentation du nombre de cellules IBA-1 positives dans la strie et les tissus voisins (bordure latérale de la strie qui est richement vascularisée) et on note ce qui semble être une infiltration mineure de microglie au sein du ganglion. Il semble cependant y avoir moins de cellules positives près de l'OC. Aucun changement majeur n'a été observé pour les autres conditions, c'est pourquoi elles ne sont pas présentées ici.

Bien que nos résultats suggèrent une augmentation légère de l'activité inflammatoire au sein de la cochlée, celle-ci reste modérée. En effet, l'intensité et la durée du trauma peuvent influencer l'importance de la réponse inflammatoire, menant à un recrutement variable de cellules immunitaires et à l'activation microgliale⁸⁰. Il est donc probable que l'intensité, ainsi que la durée de notre trauma sonore ne soient pas suffisantes pour déclencher une inflammation massive.

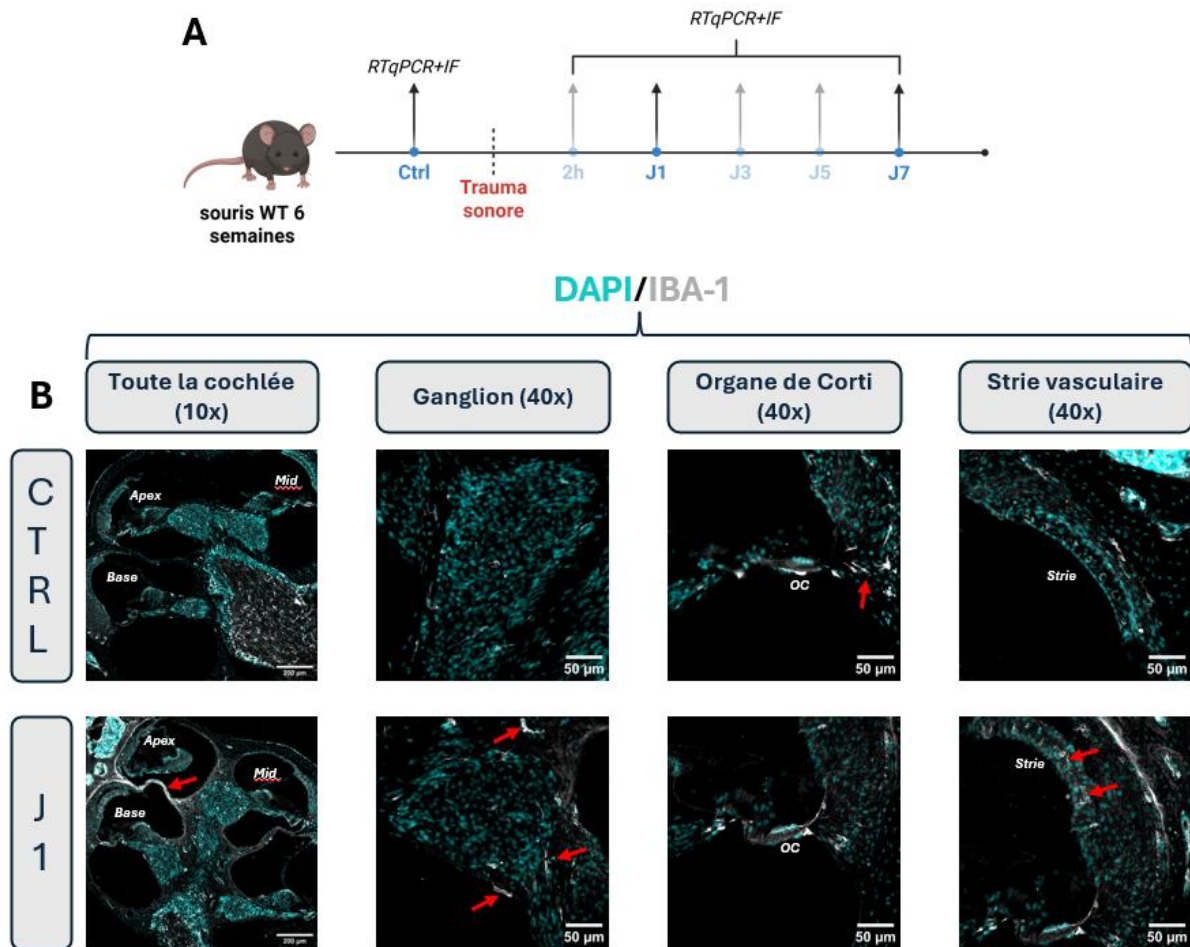


Figure 17 : Etude de l'activation de la microglie après trauma sonore.

A. Schéma expérimental : les souris ont été exposées durant 2h à des sons de 98 dB. Les cochlées ont été récoltées à différents temps pré et post-trauma sonore, afin d'extraire les ARNs et réaliser des coupes cochléaires pour analyse par RT-qPCR et immunomarquages, respectivement.

B. Immunomarquages pour IBA-1 (marqueur microgliale) et DAPI (noyaux) sur coupes cochléaires de souris adultes exposées ou non (ctrl) à un traumatisme sonore. Les images globales sont acquises à l'objectif 10x pour visualiser l'ensemble de la structure cochléaire, avec des agrandissements au 40x dans le tour médian ciblant le ganglion spiral, l'organe de Corti et la strie vasculaire.

2.2.2. Effet du traumatisme sonore sur le profil d'expression des gélatinases

Malgré une inflammation cochléaire modeste, nous avons essayé de déterminer si notre protocole de trauma sonore pouvait induire des changements dans le profil d'expression des gélatinases dans l'oreille interne.

Tout d'abord, des RT-qPCR ont été effectuées sur l'ensemble du tissu cochléaire, afin de déterminer les niveaux de transcrits MMP2 et MMP9 chez les souris à différents temps après trauma (3 souris par condition). Nous pouvons voir dans la figure 18 que les niveaux de MMP9 restent relativement constants après trauma, on observe toutefois une légère augmentation à J3, accompagnée d'une chute à J7 mais aucune de ces variations n'est statistiquement significative au vu de la grande variabilité entre les échantillons. MMP2 suit une autre tendance puisque sa transcription semble augmenter jusqu'à J1 après trauma, avant de diminuer progressivement dans les autres conditions. Un contrôle de l'inflammation a aussi été réalisé en analysant l'expression d'IL-1 β . La transcription de cette cytokine augmente légèrement 2 h après l'exposition sonore avant de revenir à un niveau proche de celui du contrôle.

En résumé, ces résultats suggèrent une régulation différente des deux protéines à la suite d'un traumatisme sonore. Il est cependant difficile de concilier les résultats de RT-qPCR avec les résultats obtenus précédemment sur les organes de Corti ex-vivo traités à l'IL-1 β . En effet, l'inflammation, et en particulier l'induction d'IL-1 β n'est pas évidente suite au trauma sonore. De plus, seul MMP9 était induit par l'IL-1 β en culture. Il faudrait donc réitérer cette expérience avec plus d'échantillons afin d'établir des conclusions plus robustes.

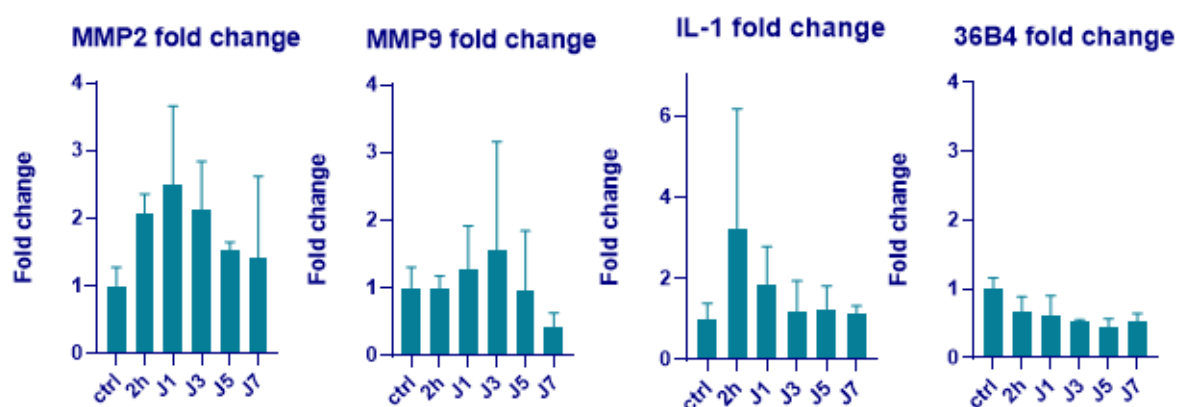


Figure 18 : Etude des niveaux de transcrits MMP2 et MMP9 par RT-qPCR après trauma sonore

Des RT-qPCR ont été effectuées sur les transcrits de MMP2, MMP9, IL-1 β et 36B4 à partir de cochlées extraites de souris adultes traumatisées comme décrit dans la figure 6A. Les résultats ont été normalisés sur la moyenne des gènes de référence (GAPDH, β -actine), et rapportés à la valeur obtenue pour la condition contrôle (souris non exposées). Ils sont présentés sous forme de valeur moyenne \pm SD (n=3). L'anova à un facteur a été utilisée comme test statistique (pval > 0,05)

Afin d'analyser l'expression de MMP2 et MMP9 au niveau protéique et connaître les compartiments cochléaires et les types cellulaires qui l'expriment, des immunomarquages spécifiques ont également été réalisés sur les coupes cochléaires à différents temps post-exposition sonore (voir schéma expérimental Figure 17A). Comme illustré dans la figure 19, chez les souris contrôles, on remarque que les deux protéines sont peu présentes. MMP2 se localise principalement dans la capsule otique, le limbus spiral et autour du ganglion spiral tandis que MMP9 est plus spécifiquement concentré dans l'organe de Corti et dans le ganglion spiral. Après trauma, on constate une augmentation de MMP2 dès J1 dans les compartiments où la protéine était déjà exprimée dans la condition contrôle. Contrairement aux résultats publiés précédemment, nous n'observons pas d'augmentation de MMP2 dans la strie vasculaire, en revanche nous observons qu'elle s'accumule particulièrement dans le tissu osseux. Sur les images prises au 40x, MMP9 paraît également plus concentré dans le ganglion et dans l'OC à J1 et c'est encore plus marqué à J7. Ces résultats révèlent un profil d'expression différent entre les deux protéines, ainsi que des changements dans leur expression après trauma. Il faudrait cependant, comme pour l'expérience précédente, répéter la procédure sur d'autres échantillons pour conclure plus précisément sur la régulation des gélatinases dans la cochlée après trauma.

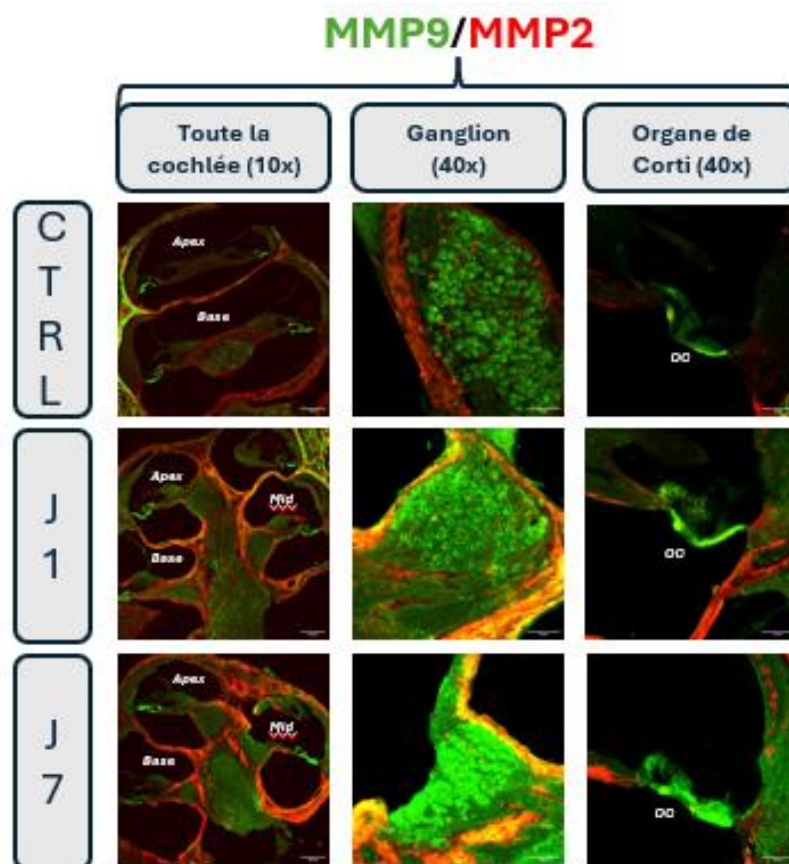


Figure 19 : Etude par immunofluorescence de l'expression de MMP2 et MMP9 après trauma sonore.

Immunomarquages pour MMP2 et MMP9 sur coupes cochléaires de souris adultes exposées ou non (ctrl) à un traumatisme sonore, selon le protocole décrit dans la figure 6A. Les images globales sont acquises à l'objectif 10x pour visualiser l'ensemble de la structure cochléaire, avec des agrandissements au 40x dans le tour médian ciblant le ganglion spiral et l'organe de Corti.

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent qu'une surexposition sonore, ayant induit une réponse inflammatoire modeste, pourrait conduire à l'augmentation transcriptionnelle des deux gélatinases au sein de l'oreille interne. Alors que MMP2 s'accumulerait dans le compartiment osseux protégeant le tissu cochléaire (absent de nos cultures d'explants), les taux de la protéine MMP9 augmenteraient spécifiquement dans l'organe de Corti et les neurones du ganglion spiral. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour vérifier ces observations et explorer le rôle bénéfique ou délétère des gélatinases dans ce contexte.

Discussion

L'intégrité de la matrice extracellulaire est essentielle au maintien structurel et physiologique de la cochlée, plusieurs mutations affectant les gènes codant pour ses composants étant responsables de surdité. Au cours de mon mémoire, nous nous sommes concentrés sur une famille de métalloprotéinases matricielles importantes dans la régulation de la MEC, les gélatinases, dont le rôle dans l'oreille interne n'a pas encore été élucidé.

Dans la première partie de l'étude, nous nous sommes concentrés sur le rôle de MMP2 dans la fonction auditive. En comparant l'audition de souris sauvages et invalidées pour ce gène, nous avons montré que MMP2 n'est pas nécessaire au développement cochléaire et à l'établissement de sa fonction mais qu'il pourrait contribuer aux dégâts tissulaires et au déclin auditif liés au vieillissement, la presbycusie. Dans la deuxième partie, nous avons étudié l'expression des deux gélatinases dans des contextes d'inflammation cochléaire, un processus étroitement associé aux pertes auditives liées à l'âge et à la surexposition sonore. En culture la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β n'a pas eu d'impact significatif sur l'expression de MMP2. Elle a néanmoins provoqué une induction forte et progressive de MMP9 au niveau transcriptionnel, ainsi que son accumulation protéique dans la région des cellules ciliées. Dans notre modèle de traumatisme sonore, seule une réponse inflammatoire modeste a été déclenchée, ce qui n'a pas permis d'observer une augmentation significative des taux de transcrits MMP2 et MMP9 cochléaires. L'analyse du tissu otique suggère toutefois une accumulation protéique de MMP2 dans les structures osseuses alors que l'expression de MMP9 a tendance à augmenter dans l'organe de Corti et le ganglion spiral.

Le développement cochléaire et le rôle de MMP2

À 8 semaines, aucune différence significative n'a été observée entre les souris WT et les souris KO pour MMP2, que ce soit au niveau des seuils auditifs ou de l'amplitude du pic 1 d'ABR. Ces résultats suggèrent que MMP2 ne joue pas un rôle essentiel dans le développement cochléaire, étant donné que la cochlée murine atteint une maturité structurelle et fonctionnelle dès la deuxième semaine postnatale chez la souris, à P14⁸¹. Au laboratoire, l'étude des profils d'expression de MMP2 et MMP9 au cours du développement otique indiquait pourtant des variations de niveau et de localisation qui présageaient d'un rôle potentiel. En effet, des analyses de RT-qPCR ont montré une forte augmentation de leur transcription après la naissance jusqu'à P7, suivie d'un net déclin à partir de P15 jusqu'à l'âge adulte. Des expériences d'immunofluorescence ont pu démontrer que la protéine MMP2 s'accumule progressivement dans la MB, le limbus spiral et le ligament spiral, atteignant un maximum à P15 et diminuant par

la suite. Au cours de cette période postnatale, l'organisation tissulaire est drastiquement modifiée par la création d'espaces intercellulaires et la maturation des membranes tectoriale et basilaire^{82 83}. En particulier, les laminines et le collagène de type IV, substrats de MMP2, subissent une régulation dynamique et complexe⁸⁴ au sein de ces structures afin d'y assurer les caractéristiques tonotopiques. Puisque l'absence de MMP2 ne perturbe pas l'établissement de la fonction auditive, il est probable que d'autres facteurs puissent garantir le remodelage des membranes cochléaires et de l'épithélium sensoriel durant cette période. De même, MMP2 ne semble pas jouer un rôle dans l'innervation de l'organe de Corti par les NGSs, alors que son inhibition spécifique par un inhibiteur pharmacologique entraînait une réduction significative du nombre et de la longueur des neurites émis à P5 par les explants en culture⁸⁵.

Plusieurs études menées dans d'autres systèmes ont mis en évidence des conséquences importantes de la délétion de MMP2 sur le développement osseux (altération de l'ossification crânienne⁸⁶, anomalies du réseau canaliculaire ostéocytaire⁸⁷) ainsi que sur le développement neurologique (anomalies dendritiques dans le cervelet⁸⁸, troubles moteurs et cognitifs⁸⁹). Ces données démontrent que MMP2 joue un rôle essentiel dans des processus morphogénétiques complexes, mais l'absence de phénotype cochléaire dans les KO suggère un mécanisme de compensation fonctionnelle. MMP9 constitue un candidat de choix pour assurer cette fonction, mais l'étendue des phénomènes compensatoires peut varier selon le contexte biologique, dépendant à la fois de l'expression et de l'activité de chaque gélatinase. Ainsi, les fonctions de MMP2 et MMP9 sont totalement redondantes lors de la migration des cellules de la crête neurale⁹⁰ et seulement partiellement lors de l'invasion tumorale et la vascularisation^{91 92}. En revanche, MMP2 et MMP9 jouent des rôles distincts dans la progression d'une forme d'arthrite⁹³. Le développement d'un modèle de souris double KO MMP2/MMP9 permettrait d'évaluer de façon plus précise les contributions redondantes ou synergiques de ces deux gélatinases au cours du développement cochléaire⁹¹.

MMP2 : un facteur aggravant de la presbyacousie chez la souris et l'Homme ?

En analysant les seuils auditifs de souris à différentes fréquences au cours du vieillissement, nous avons montré que la délétion de MMP2 permet de retarder significativement la progression et la sévérité de la presbyacousie. Ces résultats pourraient être expliqués par l'effet de MMP2 sur les structures vasculaires, en particulier la strie. Une étude a en effet mis en évidence qu'une délétion de MMP2 permettrait de diminuer l'inflammation vasculaire et l'infiltration immunitaire dans un modèle animal d'inflammation des vaisseaux induite par l'angiotensine II⁹⁴. La protéine pourrait donc contribuer à la dégradation de la barrière hémato-labyrinthique, ce qui favoriserait

ou amplifierait les dommages cochléaires associés à l'âge. En effet, la perte de cette barrière est associée à la presbyacousie⁹⁵ mais également aux surdités liées à une pathologie auto-immune, à la maladie de Ménière et aux syndromes de Pendred⁹⁶ et d'Alport. Concernant ce dernier, une étude a d'ailleurs montré que les défauts structurels des capillaires de la strie étaient corrélés à la surexpression de plusieurs MMPs, dont MMP2 et MMP9. L'utilisation d'un inhibiteur non sélectif conduit à l'exacerbation des défauts de la strie, soulignant à nouveau les connexions complexes existant entre les MMPs, la strie et les surdités⁹⁷. Il serait judicieux d'évaluer l'épaisseur de la strie vasculaire sur des coupes colorées à l'hématoxyline/éosine, dans la mesure où son atrophie est fréquemment corrélée à la presbyacousie. Pour affiner cette analyse, une observation en microscopie électronique à transmission permettrait d'identifier avec plus de précision d'éventuelles altérations morphologiques, telles qu'un épaissement de la membrane basale des capillaires. En complément, l'étude de la perméabilité vasculaire pourrait être envisagée par injection intravasculaire d'un traceur, comme la ferritine, afin de déterminer s'il diffuse dans l'espace périvasculaire, signe d'un dysfonctionnement de la barrière. Une telle approche permettrait d'évaluer si l'effet protecteur observé dans notre modèle murin MMP2 KO pourrait être lié à une meilleure préservation de l'architecture vasculaire cochléaire.

Il est également possible que l'effet délétère de MMP2 soit lié au remodelage des PNNs, la MEC présente autour des synapses auditives qui assure leur stabilité. La perte de connexions entre les CCIs et NGSs de type I constitue en effet le premier trouble cochléaire lié à l'âge⁹⁸. Elle est suivie, des semaines plus tard, par une dégénérescence neuronale. Sous l'action de MMP2, la densité des PNNs pourrait s'avérer insuffisante pour garantir le couplage des machineries pré- et post-synaptiques et la transmission des informations sonores. Pour vérifier cette hypothèse, des marquages de Ctbp2/Ribeye et GluR2 pourraient être réalisés dans les régions basales de cochlées d'animaux sauvages et invalidés pour MMP2, afin de quantifier les synapses doublement marquées.

Chez l'homme, une association entre des polymorphismes de MMP2 et l'apparition de la presbyacousie a récemment été rapportée, suggérant un rôle contextuel de MMP2⁷⁵. Puisque la perte de MMP2 chez la souris permet de protéger contre les pertes auditives liées à l'âge, nous pensons que le variant pathologique du gène humain pourrait conduire à un gain de fonction. En augmentant l'expression, la stabilité ou l'activité de MMP2, ce polymorphisme majorerait les effets délétères de MMP2 au cours du vieillissement cochléaire. Malgré qu'elles ne soient pas fréquentes, certaines mutations de ce genre ont déjà été décrites pour les MMPs dans d'autres contextes^{99 100 101}.

MMP9 est induit dans l'organe de Corti en réponse à l'IL-1 β

Les expériences réalisées ex vivo sur les organes de Corti traités par l'IL-1 β ont montré que cette cytokine augmente la transcription de MMP9, mais pas celle de MMP2. Par immunomarquage, nous avons constaté que la protéine MMP9 s'accumule en bordure de l'OC, dans la région des cellules ciliées, mais MMP2 n'a pas pu être détectée.

Concernant MMP2, ces résultats sont étonnants car plusieurs articles ont mis en évidence l'induction de son expression par l'IL-1 β dans d'autres tissus. La transcription de MMP2 est en effet augmentée par l'IL-1 β dans des fibroblastes, des cellules endothéliales microvasculaires cardiaques^{102 103} ou encore au sein des chondrocytes, ce qui faciliterait la dégradation du collagène et de la matrice extracellulaire, typique des processus inflammatoires articulaires¹⁰⁴. Il est possible que les résultats obtenus pour MMP2 puissent être expliqués par une faible expression de ce gène dans l'OC néonatal en culture. Cette hypothèse contraste cependant avec une autre étude qui a mis en évidence des taux élevés de transcrits MMP2 dans l'OC de rats âgés de 5 jours¹⁰⁵.

Pour MMP9, l'augmentation de son expression cochléaire en réponse à l'IL-1 β pourrait potentiellement contribuer à exacerber l'inflammation. En effet, plusieurs études ont mis en évidence qu'il était capable de cliver et d'activer diverses cytokines inflammatoires, favorisant ainsi le recrutement des macrophages et des monocytes. Plus précisément, une étude a démontré que les éosinophiles activés dans l'asthme produisaient MMP9 qui était ensuite capable de cliver la forme inactive de l'IL-1 β , ce qui était associé à des formes d'asthme plus sévères¹⁰⁶. Une autre étude a aussi montré que dans la péritonite aiguë induite par injection d'IL-1 β , MMP9, en synergie avec MMP2 potentialisait de manière directe l'action de CXCL5 et donc favorisait la migration des neutrophiles au sein de la cavité péritonéale¹⁰⁷. Outre ces effets potentiellement délétères, la surexpression de MMP9 pourrait au contraire jouer un rôle protecteur face au stress inflammatoire. En effet, une augmentation de la sécrétion de MMP9 a été associée à une augmentation du clivage du proBDNF en sa forme mature. Le BDNF étant un facteur neurotrophique essentiel pour la neurogenèse, la croissance neuritique et la plasticité synaptique¹⁰⁸, son activation par MMP9 permettrait ainsi de protéger les synapses auditives et augmenter la survie neuronale au sein de la cochlée.

Avant d'explorer quel pourrait être le rôle de cette augmentation de MMP9 en contexte inflammatoire, il serait tout d'abord nécessaire de vérifier qu'elle s'accompagne d'une augmentation de son activité enzymatique. Pour ce faire, nous pourrions effectuer un gel de zymographie à partir des échantillons d'explants traités par l'IL-1 β . Ce dernier permettrait de

détecter spécifiquement les variations d'activité des gélatinases dans les conditions traitées. Alternativement, des WB permettant de distinguer la forme inactive de la forme clivée, active, pourrait également aider à répondre à cette question. Par la suite, il serait intéressant de réaliser des expériences de RT-qPCR ou d'ELISA pour évaluer quel type de réponse, pro-inflammatoire ou neuroprotectrice, est déclenchée par MMP9 en réponse à l'IL-1 β . Enfin, des bioassays fonctionnels pourront être envisagés pour savoir si MMP9 potentialise ou atténue les dégâts cochléaires liés à l'inflammation. Ces tests devraient être réalisés *in vivo* suite à l'injection transtympanique d'IL-1 β ou sur des souris âgées ou traumatisées, en comparant les effets observés sur le recrutement leucocytaire ainsi que sur la fonction auditive des souris sauvages ou dépourvues de MMP9.

Profil d'expression des gélatinases après traumatisme sonore

Afin d'analyser l'évolution de l'expression des gélatinases après trauma, des RT-qPCR ont été réalisées sur des oreilles internes récoltées à différents temps post-exposition sonore. Malgré l'absence de signification statistique et un faible nombre d'échantillons analysés, les résultats de RT-qPCR suggèrent une augmentation légère et transitoire de la transcription de MMP2 à J1 alors que MMP9 tendrait à augmenter légèrement à J3 pour décliner ensuite à J7. Ces résultats sont surprenants à plus d'un titre.

Premièrement, une étude réalisée précédemment rapporte une forte hausse de l'expression des protéines MMP2 et MMP9 quelques heures après que des cochons d'inde furent exposés à des bruits blancs d'une intensité de 120 dB pendant 4 heures, 2 jours d'affilée⁷³. Ce protocole de traumatisme sonore est bien plus violent que le nôtre, puisque nous n'avons exposé nos souris qu'à des sons d'une intensité maximale de 98 dB durant 2 heures. L'échelle des décibels étant logarithmique, une différence de plus de 20 dB est conséquente et pourrait expliquer la faible réponse inflammatoire observée dans notre cas (IL-1 β n'est que faiblement induit au cours des premières 24h) ainsi que la faible régulation des taux de MMP2 et MMP9. Par ailleurs, nos résultats suggèrent une augmentation du niveau protéique des gélatinases dans différents compartiments. Plutôt que de s'accumuler toutes deux dans la strie comme démontré chez le cochon d'Inde⁷³, MMP2 voit son expression augmenter dans la capsule otique, le limbus spiral, la membrane de Reissner et autour du ganglion spiral, tandis que MMP9 se concentre dans l'OC et le ganglion spiral.

L'augmentation de l'expression de MMP2, majoritairement observée dans le compartiment osseux est intéressante, puisque plusieurs études ont mis en évidence l'importance de cette protéine dans l'os. L'une d'entre elles a d'ailleurs associé une mutation inactivatrice de MMP2 à

une perte de densité osseuse, accompagnée de défauts crânio-faciaux, de sutures crâniennes sclérotiques et d'une destruction du cartilage articulaire¹⁰⁹. De plus, une localisation différentielle de MMP2 et MMP9, enrichie dans des compartiments cochléaires distincts, est appuyée par d'autres études réalisées chez la souris¹¹⁰.

Enfin, il est difficile d'établir des conclusions robustes sur ces expériences étant donné les divergences existantes entre les résultats de RT-qPCR et d'immunofluorescence, en termes d'ampleur d'effet ainsi que de leur cinétique. Celles-ci pourraient bien sûr s'expliquer par le fait que la transcription et la teneur en protéine sont régulées différemment dans les cellules, sans nécessairement être corrélées. Par exemple, la traduction protéique ou la stabilité des protéines pourraient augmenter après un traumatisme, même si la production d'ARN messager reste inchangée. Par ailleurs, pour les RT-qPCR, l'ARN extrait provient de l'ensemble de la cochlée (capsule otique, modiolus et OC), reflétant ainsi un mélange de différents compartiments. En revanche, les immunomarquages, bien que peu quantitatifs, permettent une localisation précise et nous nous sommes concentrés ici exclusivement sur la région de la scala media.

En perspective de ce travail, outre l'augmentation du nombre d'échantillons testés dans nos diverses analyses, nous envisageons d'analyser l'audition de souris invalidées pour MMP2 ou MMP9 suite au traumatisme sonore. Cette approche permettrait d'évaluer l'impact individuel de chaque gélatinase sur la fonction auditive dans un contexte de lésion acoustique. De même, les enregistrements ABR et DPOAEs au cours du temps, de souris invalidées pour MMP9, permettront de statuer sur le rôle potentiel de MMP9 au cours du développement et dans la presbyacousie.

Parallèlement, des inhibiteurs spécifiques de MMP2 et MMP9 (ARP100 et AG-L-66085, respectivement ou SB-3CT ciblant les deux), pourraient être injectés aux souris sauvages dans le but de confirmer nos conclusions par une autre approche expérimentale que celle des modèles génétiques. Outre la validation de nos découvertes, cette approche permettrait de tester différentes fenêtres d'application, ouvrant ainsi des perspectives thérapeutiques pour les individus à risque de développer des pertes auditives liées à leurs activités professionnelles, récréatives ainsi qu'au vieillissement.

Références

1. Cunningham, L. L. & Tucci, D. L. Hearing Loss in Adults. *N Engl J Med* **377**, 2465–2473 (2017).
2. Heine, P. A. Anatomy of the ear. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **34**, 379–395 (2004).
3. Eatock, R. A. & Songer, J. E. Vestibular Hair Cells and Afferents: Two Channels for Head Motion Signals. *Annu. Rev. Neurosci.* **34**, 501–534 (2011).
4. Raphael, Y. & Altschuler, R. A. Structure and innervation of the cochlea. *Brain Research Bulletin* **60**, 397–422 (2003).
5. Nin, F. *et al.* The endocochlear potential depends on two K⁺ diffusion potentials and an electrical barrier in the stria vascularis of the inner ear. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 1751–1756 (2008).
6. Hudspeth, A. J. How the ear's works work. *Nature* **341**, 397–404 (1989).
7. Xie, Z. *et al.* ZBTB20 is essential for cochlear maturation and hearing in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **120**, e2220867120 (2023).
8. Goutman, J. D., Elgoyhen, A. B. & Gómez-Casati, M. E. Cochlear hair cells: The sound-sensing machines. *FEBS Letters* **589**, 3354–3361 (2015).
9. Hakizimana, P. & Fridberger, A. Inner hair cell stereocilia are embedded in the tectorial membrane. *Nat Commun* **12**, 2604 (2021).
10. Matthews, G. & Fuchs, P. The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission. *Nat Rev Neurosci* **11**, 812–822 (2010).
11. Legendre, K., Petit, C. & El-Amraoui, A. La cellule ciliée externe de la cochlée des mammifères: Un amplificateur aux propriétés exceptionnelles. *Med Sci (Paris)* **25**, 117–120 (2009).
12. Ashmore, J. Cochlear Outer Hair Cell Motility. *Physiological Reviews* **88**, 173–210 (2008).
13. Zheng, J. *et al.* Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* **405**, 149–155 (2000).
14. Jung, J. *et al.* MYH1 deficiency disrupts outer hair cell electromotility, resulting in hearing loss. *Exp Mol Med* **56**, 2423–2435 (2024).
15. Ramírez-Camacho, R. *et al.* Central role of supporting cells in cochlear homeostasis and pathology. *Medical Hypotheses* **67**, 550–555 (2006).
16. Zhao, H.-B., Kikuchi, T., Ngezahayo, A. & White, T. W. Gap Junctions and Cochlear Homeostasis. *J Membrane Biol* **209**, 177–186 (2006).
17. Chen, T. *et al.* Cochlear supporting cells require GAS2 for cytoskeletal architecture and hearing. *Developmental Cell* **56**, 1526–1540.e7 (2021).
18. Hayashi, Y. *et al.* Cochlear supporting cells function as macrophage-like cells and protect audiosensory receptor hair cells from pathogens. *Sci Rep* **10**, 6740 (2020).

19. Li, X., Morgan, C., Nadar-Ponniah, P. T., Kolanus, W. & Doetzlhofer, A. TRIM71 reactivation enhances the mitotic and hair cell-forming potential of cochlear supporting cells. *EMBO Reports* **24**, e56562 (2023).
20. Heil, P. & Peterson, A. J. Basic response properties of auditory nerve fibers: a review. *Cell Tissue Res* **361**, 129–158 (2015).
21. Sun, S. *et al.* Hair Cell Mechanotransduction Regulates Spontaneous Activity and Spiral Ganglion Subtype Specification in the Auditory System. *Cell* **174**, 1247–1263.e15 (2018).
22. Liu, C., Glowatzki, E. & Fuchs, P. A. Unmyelinated type II afferent neurons report cochlear damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 14723–14727 (2015).
23. Fuchs, P. A. & Lauer, A. M. Efferent Inhibition of the Cochlea. *Cold Spring Harb Perspect Med* **9**, a033530 (2019).
24. Nin, F. *et al.* The endocochlear potential depends on two K⁺ diffusion potentials and an electrical barrier in the stria vascularis of the inner ear. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 1751–1756 (2008).
25. Lang, H. *et al.* The Stria Vascularis in Mice and Humans Is an Early Site of Age-Related Cochlear Degeneration, Macrophage Dysfunction, and Inflammation. *J. Neurosci.* **43**, 5057–5075 (2023).
26. Shepard, A. R., Scheffel, J. L. & Yu, W. Relationships between neuronal birthdates and tonotopic positions in the mouse cochlear nucleus. *J of Comparative Neurology* **527**, 999–1011 (2019).
27. MED-EL. Low Frequency Sounds with a Cochlear Implant. *The MED-EL Blog* <https://blog.medel.com/technology/hear-the-lowest-sounds-with-a-cochlear-implant/> (2015).
28. Pressé, M. T., Malgrange, B. & Delacroix, L. The cochlear matrisome: Importance in hearing and deafness. *Matrix Biology* **125**, 40–58 (2024).
29. Karamanos, N. K. *et al.* A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *The FEBS Journal* **288**, 6850–6912 (2021).
30. Kanchanawong, P. & Calderwood, D. A. Organization, dynamics and mechanoregulation of integrin-mediated cell–ECM adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **24**, 142–161 (2023).
31. Sorokin, L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol* **10**, 712–723 (2010).
32. Santi, P. A. *et al.* Scanning Electron Microscopic Examination of the Extracellular Matrix in the Decellularized Mouse and Human Cochlea. *JARO* **17**, 159–171 (2016).
33. Liu, W. *et al.* Macromolecular organization and fine structure of the human basilar membrane - RELEVANCE for cochlear implantation. *Cell Tissue Res* **360**, 245–262 (2015).
34. Kwiatkowska, M. *et al.* The expression pattern and inhibitory influence of Tenascin-C on the growth of spiral ganglion neurons suggest a regulatory role as boundary formation molecule in the postnatal mouse inner ear. *Neuroscience* **319**, 46–58 (2016).
35. Sellon, J. B., Ghaffari, R. & Freeman, D. M. The Tectorial Membrane: Mechanical Properties and Functions. *Cold Spring Harb Perspect Med* **9**, a033514 (2019).

36. Lim, D. J. Fine Morphology of the Tectorial Membrane: Its Relationship to the Organ of Corti. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery* **96**, 199–215 (1972).
37. Lukashkin, A. N. *et al.* A mouse model for human deafness DFNB22 reveals that hearing impairment is due to a loss of inner hair cell stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 19351–19356 (2012).
38. Verpy, E. *et al.* Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nat Genet* **29**, 345–349 (2001).
39. Legan, P. K. *et al.* A Targeted Deletion in α -Tectorin Reveals that the Tectorial Membrane Is Required for the Gain and Timing of Cochlear Feedback. *Neuron* **28**, 273–285 (2000).
40. Cheatham, M. A. *et al.* Loss of the Tectorial Membrane Protein CEACAM16 Enhances Spontaneous, Stimulus-Frequency, and Transiently Evoked Otoacoustic Emissions. *Journal of Neuroscience* **34**, 10325–10338 (2014).
41. Jeng, J. *et al.* MET currents and otoacoustic emissions from mice with a detached tectorial membrane indicate the extracellular matrix regulates Ca^{2+} near stereocilia. *The Journal of Physiology* **599**, 2015–2036 (2021).
42. Fawcett, J. W., Oohashi, T. & Pizzorusso, T. The roles of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function. *Nat Rev Neurosci* **20**, 451–465 (2019).
43. Reichelt, A. C., Hare, D. J., Bussey, T. J. & Saksida, L. M. Perineuronal Nets: Plasticity, Protection, and Therapeutic Potential. *Trends in Neurosciences* **42**, 458–470 (2019).
44. Sonntag, M. *et al.* Synaptic coupling of inner ear sensory cells is controlled by brevican-based extracellular matrix baskets resembling perineuronal nets. *BMC Biol* **16**, 99 (2018).
45. Mishra, S., Pandey, H., Srivastava, P., Mandal, K. & Phadke, S. R. Connexin 26 (GJB2) Mutations Associated with Non-Syndromic Hearing Loss (NSHL). *Indian J Pediatr* **85**, 1061–1066 (2018).
46. Acharya, P. *et al.* Select autosomal dominant DFNA11 deafness variants activate Myo7A targeting in epithelial cells. *Journal of Cell Science* **138**, jcs263982 (2025).
47. Zhao, Y. *et al.* Exome Sequencing and Linkage Analysis Identified Tenascin-C (TNC) as a Novel Causative Gene in Nonsyndromic Hearing Loss. *PLoS ONE* **8**, e69549 (2013).
48. Avan, P. *et al.* Otogelin, otogelin-like, and stereocilin form links connecting outer hair cell stereocilia to each other and the tectorial membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 25948–25957 (2019).
49. Hoornaert, K. P. *et al.* Stickler syndrome caused by COL2A1 mutations: genotype–phenotype correlation in a series of 100 patients. *Eur J Hum Genet* **18**, 872–880 (2010).
50. Mochizuki, T. *et al.* Identification of mutations in the $\alpha 3(\text{IV})$ and $\alpha 4(\text{IV})$ collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat Genet* **8**, 77–82 (1994).
51. Nishio, S. *et al.* Gene Expression Profiles of the Cochlea and Vestibular Endorgans: Localization and Function of Genes Causing Deafness. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **124**, 6S–48S (2015).

52. Bowl, M. R. & Dawson, S. J. Age-Related Hearing Loss. *Cold Spring Harb Perspect Med* **9**, a033217 (2019).
53. Bullen, A. *et al.* Ultrastructural defects in stereocilia and tectorial membrane in aging mouse and human cochleae. *J of Neuroscience Research* **98**, 1745–1763 (2020).
54. Thomopoulos, G. N., Spicer, S. S., Gratton, M. A. & Schulte, B. A. Age-related thickening of basement membrane in stria vascularis capillaries. *Hearing Research* **111**, 31–41 (1997).
55. Zhang, Q. *et al.* Identifying MicroRNAs Involved in Degeneration of the Organ of Corti during Age-Related Hearing Loss. *PLoS ONE* **8**, e62786 (2013).
56. Kurabi, A., Keithley, E. M., Housley, G. D., Ryan, A. F. & Wong, A. C.-Y. Cellular mechanisms of noise-induced hearing loss. *Hearing Research* **349**, 129–137 (2017).
57. Jongkamonwiwat, N. *et al.* Noise Exposures Causing Hearing Loss Generate Proteotoxic Stress and Activate the Proteostasis Network. *Cell Reports* **33**, 108431 (2020).
58. Shi, M. *et al.* Acute Noise Causes Down-Regulation of ECM Protein Expression in Guinea Pig Cochlea. *Mol Biotechnol* **65**, 774–785 (2023).
59. Wu, J. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 and -9 contribute to functional integrity and noise-induced damage to the blood-labyrinth-barrier. *Molecular Medicine Reports* **16**, 1731–1738 (2017).
60. Lee, H. S. & Kim, W. J. The Role of Matrix Metalloproteinase in Inflammation with a Focus on Infectious Diseases. *IJMS* **23**, 10546 (2022).
61. Muneer, P. M. A., Pfister, B. J., Haorah, J. & Chandra, N. Role of Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol* **53**, 6106–6123 (2016).
62. Bassiouni, W., Ali, M. A. M. & Schulz, R. Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. *The FEBS Journal* **288**, 7162–7182 (2021).
63. Cabral-Pacheco, G. A. *et al.* The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *IJMS* **21**, 9739 (2020).
64. Kessenbrock, K., Plaks, V. & Werb, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* **141**, 52–67 (2010).
65. Baudina, B. & Braiekb, A. B. Les métalloprotéases et leurs inhibiteurs dans la maladie coronarienne artérielle. *Revue Francophone des Laboratoires* **2023**, 38–45 (2023).
66. Wu, W.-S. *et al.* Snail collaborates with EGR-1 and SP-1 to directly activate transcription of MMP 9 and ZEB1. *Sci Rep* **7**, 17753 (2017).
67. Van Den Steen, P. E., Opdenakker, G., Wormald, M. R., Dwek, R. A. & Rudd, P. M. Matrix remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1528**, 61–73 (2001).
68. Sariahmetoglu, M. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity by phosphorylation. *FASEB j.* **21**, 2486–2495 (2007).
69. Serifova, X., Ugarte-Berzal, E., Opdenakker, G. & Vandooren, J. Homotrimeric MMP-9 is an active hitchhiker on alpha-2-macroglobulin partially escaping protease inhibition and internalization through LRP-1. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 3013–3026 (2020).

70. Arpino, V., Brock, M. & Gill, S. E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biology* **44–46**, 247–254 (2015).
71. Kundu, S., Tyagi, N., Sen, U. & Tyagi, S. C. Matrix imbalance by inducing expression of metalloproteinase and oxidative stress in cochlea of hyperhomocysteinemic mice. *Mol Cell Biochem* **332**, 215–224 (2009).
72. Cadoni, G., Agostino, S., Scipione, S. & Galli, J. Low serum folate levels: a risk factor for sudden sensorineural hearing loss? *Acta Oto-Laryngologica* **124**, 608–611 (2004).
73. Wu, J. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 and -9 contribute to functional integrity and noise-induced damage to the blood-labyrinth-barrier. *Molecular Medicine Reports* **16**, 1731–1738 (2017).
74. Park, S., Lee, D., Lee, S. M., Lee, C. H. & Kim, S. Y. Noise exposure alters MMP9 and brevicin expression in the rat primary auditory cortex. *BMC Neurosci* **21**, 16 (2020).
75. Liu, W., Johansson, Å., Rask-Andersen, H. & Rask-Andersen, M. A combined genome-wide association and molecular study of age-related hearing loss in *H. sapiens*. *BMC Med* **19**, 302 (2021).
76. Itoh, T. *et al.* Unaltered Secretion of β -Amyloid Precursor Protein in Gelatinase A (Matrix Metalloproteinase 2)-deficient Mice. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 22389–22392 (1997).
77. Li, W.-L. *et al.* Local Inflammation Alters MMP-2 and MMP-9 Gelatinase Expression Associated with the Severity of Nifedipine-Induced Gingival Overgrowth: a Rat Model Study. *Inflammation* **38**, 1517–1528 (2015).
78. Zhang, H. *et al.* MMP9 protects against LPS-induced inflammation in osteoblasts. *Innate Immun* **26**, 259–269 (2020).
79. Nascimento, G. C., De Paula, B. B., Gerlach, R. F. & Leite-Panissi, C. R. A. Temporomandibular inflammation regulates the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in limbic structures. *Journal Cellular Physiology* **236**, 6571–6580 (2021).
80. Baizer, J. S. *et al.* Effects of acoustic trauma on the auditory system of the rat: The role of microglia. *Neuroscience* **303**, 299–311 (2015).
81. Driver, E. C. & Kelley, M. W. Development of the cochlea. *Development* **147**, dev162263 (2020).
82. Tani, T., Koike-Tani, M., Tran, M. T., Shribak, M. & Levic, S. Postnatal structural development of mammalian Basilar Membrane provides anatomical basis for the maturation of tonotopic maps and frequency tuning. *Sci Rep* **11**, 7581 (2021).
83. Goodyear, R. J. & Richardson, G. P. Structure, Function, and Development of the Tectorial Membrane: An Extracellular Matrix Essential for Hearing. in *Current Topics in Developmental Biology* vol. 130 217–244 (Elsevier, 2018).
84. Rodgers, K. D., Barritt, L., Miner, J. H. & Cosgrove, D. The laminins in the murine inner ear: developmental transitions and expression in cochlear basement membranes. *Hearing Research* **158**, 39–50 (2001).
85. Sung, M. *et al.* Inhibition of MMP-2 but not MMP-9 Influences Inner Ear Spiral Ganglion Neurons In Vitro. *Cell Mol Neurobiol* **34**, 1011–1021 (2014).

86. Mosig, R. A. *et al.* Loss of MMP-2 disrupts skeletal and craniofacial development and results in decreased bone mineralization, joint erosion and defects in osteoblast and osteoclast growth. *Human Molecular Genetics* **16**, 1113–1123 (2007).
87. Inoue, K. *et al.* A Crucial Role for Matrix Metalloproteinase 2 in Osteocytic Canalicular Formation and Bone Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 33814–33824 (2006).
88. Verslegers, M. *et al.* MMP-2 mediates Purkinje cell morphogenesis and spine development in the mouse cerebellum. *Brain Struct Funct* **220**, 1601–1617 (2015).
89. Li, Q. *et al.* MMP-2: A modulator of neuronal precursor activity and cognitive and motor behaviors. *Behavioural Brain Research* **333**, 74–82 (2017).
90. Kalev-Altman, R. *et al.* Conserved role of matrix metalloproteases 2 and 9 in promoting the migration of neural crest cells in avian and mammalian embryos. *The FASEB Journal* **34**, 5240–5261 (2020).
91. Masson, V. *et al.* Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes. *FASEB j.* **19**, 1–17 (2005).
92. Lambert, V. *et al.* MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization. *FASEB j.* **17**, 2290–2292 (2003).
93. Itoh, T. *et al.* The Role of Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9 in Antibody-Induced Arthritis. *The Journal of Immunology* **169**, 2643–2647 (2002).
94. Barhoumi, T. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 knockout prevents angiotensin II-induced vascular injury. *Cardiovascular Research* **113**, 1753–1762 (2017).
95. Heeringa, A. N. & Köppl, C. The aging cochlea: Towards unraveling the functional contributions of stria dysfunction and synaptopathy. *Hearing Research* **376**, 111–124 (2019).
96. Shi, X. Physiopathology of the cochlear microcirculation. *Hearing Research* **282**, 10–24 (2011).
97. Gratton, M. A., Rao, V. H., Meehan, D. T., Askew, C. & Cosgrove, D. Matrix Metalloproteinase Dysregulation in the Stria Vascularis of Mice with Alport Syndrome. *The American Journal of Pathology* **166**, 1465–1474 (2005).
98. Liberman, M. C. & Kujawa, S. G. Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: Manifestations and mechanisms. *Hearing Research* **349**, 138–147 (2017).
99. Snipas, S. J., Jappelli, R., Torkamani, A., Paternostro, G. & Salvesen, G. S. Gain of function of a metalloproteinase associated with multiple myeloma, bicuspid aortic valve, and Von Hippel–Lindau syndrome. *Biochemical Journal* **479**, 1533–1542 (2022).
100. Rybakowski, J. K. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP9)—A Mediating Enzyme in Cardiovascular Disease, Cancer, and Neuropsychiatric Disorders. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology* **2009**, 1–7 (2009).
101. Martin-Morales, L. *et al.* Germline gain-of-function MMP11 variant results in an aggressive form of colorectal cancer. *Intl Journal of Cancer* **152**, 283–297 (2023).

102. Siwik, D. A., Chang, D. L.-F. & Colucci, W. S. Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α Decrease Collagen Synthesis and Increase Matrix Metalloproteinase Activity in Cardiac Fibroblasts In Vitro. *Circulation Research* **86**, 1259–1265 (2000).
103. Mountain, D. J. H., Singh, M., Menon, B. & Singh, K. Interleukin-1 β increases expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in cardiac microvascular endothelial cells: role of PKC α / β_1 and MAPKs. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **292**, C867–C875 (2007).
104. Choi, Y.-A. *et al.* Interleukin-1 β stimulates matrix metalloproteinase-2 expression via a prostaglandin E2-dependent mechanism in human chondrocytes. *Exp Mol Med* **36**, 226–232 (2004).
105. Setz, C. *et al.* Matrix metalloproteinases 2 and 9 in the cochlea: expression and activity after aminoglycoside exposition. *Neuroscience* **181**, 28–39 (2011).
106. Esnault, S. *et al.* Matrix Metalloproteinase-9-Dependent Release of IL-1 β by Human Eosinophils. *Mediators of Inflammation* **2019**, 1–11 (2019).
107. Song, J., Wu, C., Zhang, X. & Sorokin, L. M. In Vivo Processing of CXCL5 (LIX) by Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 Promotes Early Neutrophil Recruitment in IL-1 β -Induced Peritonitis. *The Journal of Immunology* **190**, 401–410 (2013).
108. Martinelli, S. *et al.* Stress-primed secretory autophagy promotes extracellular BDNF maturation by enhancing MMP9 secretion. *Nat Commun* **12**, 4643 (2021).
109. Martignetti, J. A. *et al.* Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nat Genet* **28**, 261–265 (2001).
110. Setz, C. *et al.* Matrix metalloproteinases 2 and 9 in the cochlea: expression and activity after aminoglycoside exposition. *Neuroscience* **181**, 28–39 (2011).