



**HAL**  
open science

## Méthode optimisée d'immunofluorescence sur cochlée entière transparente de gerbille de Mongolie

M. Risoud, M. Tardivel, P.-E. Lemesre, N.-X. Bonne, C. Vincent

► **To cite this version:**

M. Risoud, M. Tardivel, P.-E. Lemesre, N.-X. Bonne, C. Vincent. Méthode optimisée d'immunofluorescence sur cochlée entière transparente de gerbille de Mongolie. *Annales françaises d'Oto-rhino-laryngologie et de Pathologie Cervico-faciale*, 2020, 137, pp.139 - 144. 10.1016/j.aforl.2019.09.009 . hal-03491035

**HAL Id: hal-03491035**

**<https://hal.science/hal-03491035v1>**

Submitted on 22 Aug 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

*Note technique*

**Méthode optimisée d'immunofluorescence sur cochlée entière transparente de gerbille de Mongolie**

Michaël Risoud<sup>\*1,2</sup>, Meryem Tardivel<sup>3</sup>, Pierre-Emmanuel Lemesre<sup>1,2</sup>, Nicolas-Xavier Bonne<sup>1,4</sup>, Christophe Vincent<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> CHU Lille, Department of Otolaryngology and Neurotology, F-59000, Lille, France

<sup>2</sup> Univ. Lille, CHU Lille, INSERM U1008 - Controlled Drug Delivery Systems and Biomaterials, F-59000, Lille, France

<sup>3</sup> Univ. Lille, BioImaging Center Lille-Nord de France (BICeL), F-59000, Lille, France

<sup>4</sup> Univ. Lille, CHU Lille, INSERM U1192 - Proteomics Inflammatory Response Mass Spectrometry (PRISM), F-59000 Lille, France

**\* Auteur correspondant :**

Michaël RISOUD

CHU Lille

Otologie et Otoneurologie, Hôpital Roger Salengro

2 rue Emile Laine, 59037 Lille cedex, France

Tel: +33-3-20446204 Fax: +33-3-20446220

e-mail : michael.risoud@chru-lille.fr

## **Résumé**

L'immunofluorescence sur cochlée entière transparente permet l'analyse complète de l'ultrastructure cochléaire en s'affranchissant des problématiques de dissection et de coupes sériées. Des protocoles existent chez la souris et la gerbille de Mongolie. L'objectif de cette mise au point est de proposer un protocole détaillé et optimisé chez la gerbille de Mongolie avec des améliorations quantitatives et qualitatives significatives. Ainsi le protocole comprend séquentiellement : fixation (1 jour), décalcification (6 jours), pré-traitement (7h30min), immunomarquage (42 heures), déshydratation et clarification (23 heures) puis montage et acquisition en microscopie confocale à balayage laser. Ce protocole est optimisé sur le plan quantitatif et qualitatif. Ainsi, sa durée a été réduite (10 jours contre 13 jours) ainsi que le nombre d'étapes. La spécificité des immunomarquages a été améliorée de même que la qualité des résultats obtenus. Cette note technique détaille précisément l'ensemble de ce protocole.

## **Mots clefs**

Immunofluorescence ; Transparisation ; Clarification ; Cochlée ; Cellules ciliées ; Gerbille de Mongolie ; Microscopie confocale à balayage laser.

## 1. Introduction

L'immunofluorescence sur cochlée entière transparente est une technique longue et difficile mais séduisante si l'on souhaite analyser l'architecture globale d'une cochlée sans la disséquer. Cette technique a été décrite pour la Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL) en 2008 chez la souris et adaptée en 2017 chez la gerbille de Mongolie [1,2].

L'objectif de cette note technique est de présenter une version améliorée et raccourcie du protocole initialement décrit en 2017, afin d'en diminuer les étapes et d'en raccourcir la durée tout en améliorant la qualité des résultats obtenus.

## 2. Technique

### 2.1. Produits et Matériel utilisés

- Tampon phosphate salin 10X = *10X PBS – Phosphate Buffered Saline 10X Solution* (Ref : BP3994 ; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis).
- Paraformaldéhyde = *PFA* (Ref : P6148 ; Sigma-Aldrich),
- Acide éthylène diamine tétra-acétique = *EDTA* (Ref : E9884 ; Sigma-Aldrich),
- Triton X-100 (Ref : X100 ; Sigma-Aldrich).
- Gélatine de peau de poisson d'eau froide (Ref : G7041 ; Sigma-Aldrich).
- DAPI – 4',6 Diamidino-2-Phénylindole Dihydrochloride (Ref : D8417 ; Sigma-Aldrich).
- Phalloïdine-TRITC – *Phalloidin-Tetramethylrhodamine Isothiocyanate* (Ref: P1951; Sigma-Aldrich).
- Anticorps polyclonaux (IgG) de lapin anti-neurofilament 200 = *Polyclonal IgG Anti Neurofilament 200 antibodies produced in rabbit* (Ref : N4142 ; Sigma-Aldrich).

- Anticorps polyclonaux (IgG) de Lapin anti-myosine VIIA = *Polyclonal IgG Anti-MYO7A antibodies produced in rabbit* (Ref : HPA028918 ; Sigma-Aldrich).
- Anticorps polyclonaux (IgG) de chèvre anti-Prestine (C-16) = *Polyclonal IgG Anti Prestin (C-16) antibodies produced in goat* (Ref : sc-22694 ; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Etats-Unis).
- Anticorps purifiés (IgG<sub>1</sub>) de souris anti-CtBP2 = *Purified IgG<sub>1</sub> anti-CtBP2 antibodies produced in mouse* (Ref : 612044 ; BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, Etats-Unis).
- Anticorps monoclonaux (IgG<sub>1</sub>) de souris anti-parvalbumine = *Monoclonal Anti Parvalbumin antibodies (IgG<sub>1</sub>) produced in mouse* (Ref : P3088 ; Sigma-Aldrich)
- Anticorps secondaires d'âne anti-immunoglobuline G (chaîne lourde et légère) de lapin conjugué à l'Alexa Fluor 488 = *Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibodies, Alexa Fluor 488 conjugate* (Ref : A21206 ; Thermo Fisher Scientific).
- Anticorps secondaires d'âne anti-immunoglobuline G (chaîne lourde et légère) de chèvre conjugué à l'Alexa Fluor 568 = *Donkey anti-Goat IgG (H+L) Secondary Antibodies, Alexa Fluor 568 conjugate* (Ref : A11057 ; Thermo Fisher Scientific).
- Anticorps secondaires d'âne anti-immunoglobuline G (chaîne lourde et légère) de souris conjugué à l'Alexa Fluor 647 = *Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibodies, Alexa Fluor 647 conjugate* (Ref : A31571 ; Thermo Fisher Scientific).
- Ethanol Absolu (Ref : E7811 ; Alcogroup, Anet, France),
- Méthyl Salicylate (Ref : M6752 ; Sigma-Aldrich),
- Benzoate de Benzyle (Ref : B6630 ; Sigma-Aldrich),
- Solution tampon : PBS 1X.
- Solution de fixation : 4% PFA dans PBS 1X.
- Solution de décalcification : 10% EDTA en PBS 1X.

- Solution de perméabilisation : Triton X-100 0,5% en PBS 1X.
- Solution de blocage : PBSGT : PBS 1X avec 0,2% Gélatine et 0,5% Triton X-100.
- Solutions de déshydratation : Ethanol 70%, Ethanol 90% et Ethanol Absolu (100%).
- Solution de clarification (de Spalteholz) = MSBB (Méthyl-Salicylate Benzoate de Benzyl) : 5 par de Méthyl-Salicylate pour 3 parts de Benzoate de Benzyl.
- Flacons verre transparent 10 mL (Ref : 11717617 ; Thermo Fisher Scientific)
- Capsules en polyéthylène 10 mm à clipser (Ref : 11797606 ; Thermo Fisher Scientific)
- Eppendorfs de 0,2 mL (Ref : 72.737.002 ; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Allemagne)
- Lamelles cloisonnées à 8 puits =  $\mu$ -Slide 8 Well *ibiTreat* (Ref : 80826 ; ibidi, Munich, Allemagne).

## 2.2. Protocole détaillé.

Chaque cochlée fraîchement prélevée est traitée selon un protocole d'environ 10 jours dont les étapes sont détaillées dans la **Table 1**.

Les dilutions d'anticorps primaires sont de 1:200 (souris anti-CtBP2) ou 1:500 (lapin anti-NF200 et souris anti-parvalbumine). Les anticorps secondaires sont utilisés à une dilution de 1:500. La phalloïdine-TRITC est utilisée à la concentration de 15  $\mu$ g/mL et le DAPI à la concentration de 0,5  $\mu$ g/mL.

Ces dilutions sont indicatives et doivent être adaptées à chaque marque d'anticorps utilisé et à chaque condition expérimentale (taille des échantillons durée d'exposition, microscope utilisé) après une titration éventuelle.

Dès lors que l'on utilise les fluorophores, les manipulations doivent être réalisées à l'abri de la lumière.

L'Acquisition en microscopie confocale à balayage laser se fait au moyen d'un microscope confocal inversé LSM 710 avec un objectif sec EC Plan-Neofluar 10x/0,3 M27 (Carl Zeiss, Jena, Allemagne) ou Plan-Apochroma 20x/0,8 ou un objectif à immersion dans l'huile Plan-neofluar 40x/1,3 ou Plan-Apochroma 63x/1,4.

Les sources lasers utilisées pour exciter les fluorophores sont : Diode laser UV 405 nm (DAPI), Argon 488 nm (Alexa fluor 488), Laser DPSS- Diode-Pumped Solid-State laser 561 nm (TRITC ou Alexa fluor 568), Laser Hélium-Néon 633 nm (Alexa fluor 647)

Le signal d'émission de fluorescence est récupéré par des photomultiplicateurs : 2 conventionnels et 1 spectral. Le gain est de 800 Volts.

Les acquisitions sont réalisées en *Z-stacks* (récupération de l'ensemble des coupes optiques sur une hauteur définie). Le logiciel d'acquisition est Zen (Carl Zeiss).

### 2.3. Résultats

Le protocole permet d'obtenir des cochlées transparentes macroscopiquement (**Fig. 1**). A fort grossissement, l'analyse de l'Organe de Corti est possible (**Fig. 2**).

A noter qu'il peut y avoir des traumatismes induits par la dissection, notamment des lésions de la membrane basilaire lors de la fixation par perfusion cochléaire (**Fig. 3**). Ceux-ci sont donc à éviter (par une dissection et une perfusion la plus soignée et la plus douce possible) mais sont facilement identifiables le cas échéant.

Enfin, la position de la cochlée influence la qualité des images en fonction du tour cochléaire étudié. Ainsi plus le tour cochléaire est éloigné de l'objectif, plus sa qualité d'acquisition est

mauvaise, principalement par nécessité de traversée d'un volume tissulaire important qui, bien que clarifié, présente toute de même une diffraction des rayons (Exemple **Fig. 4**).

### **3. Discussion**

Nous présentons une optimisation significative du protocole d'immunofluorescence sur cochlée transparente chez la gerbille de Mongolie. Ces améliorations sont à la fois quantitatives et qualitatives.

Sur le plan quantitatif, la durée du protocole a été réduite significativement tout comme le nombre d'étapes. Ainsi sa durée a pu être réduite à 10 jours contre plus de 13 jours initialement [2] (6 jours de décalcification au lieu de 7 ; 1 jour d'anticorps primaire au lieu de 3 ; 17 heures de clarification au lieu de 22). Le nombre d'étapes a été réduit : suppression de l'amplification du signal par Image IT-FX, Phalloïdine-TRITC et DAPI utilisés simultanément avec la solution d'anticorps secondaires et non plus séparément de façon successive (permettant de supprimer quatre étapes en comptant les rinçages intermédiaires) et suppression d'un bain en MSBB. La diminution du nombre d'étapes permet de diminuer la lourdeur du protocole ainsi que de diminuer le risque d'erreurs.

Les améliorations du protocole sont aussi qualitatives afin de permettre d'obtenir de meilleurs résultats. Comme dit précédemment, l'étape d'amplification du signal par Image-IT FX est supprimée car elle n'apportait pas d'amélioration qualitative significative. L'augmentation de la concentration (0,5% contre 0,1%) et du temps d'exposition (2h contre 30min) du perméabilisant de membrane (Triton-X100) favorisait la pénétration des marqueurs spécifiques. La concentration de l'agent de blocage a été réduite pour diminuer la compétition entre les protéines bloquantes et les anticorps et améliorer le marquage spécifique, tout en continuant à bloquer les sites non spécifiques. Ainsi l'utilisation de la



gélatine de peau de poisson à 0,2% (au lieu de l'albumine de sérum bovin à 10%) a été privilégiée comme agent de blocage (meilleurs résultats concernant le blocage des sites non spécifiques [3]). En parallèle, le temps de blocage des sites non spécifiques par immersion en solution de blocage a été augmenté (4h contre 2h), toujours pour améliorer les spécificités des immunomarquages. Les temps de rinçage en PBS 1X ont été systématiquement augmentés (3 immersions de 30min chacune au lieu de 15min chacune), a fortiori après exposition aux anticorps (3 immersions de 1h chacune au lieu de 15min chacune) pour diminuer le bruit de fond et les agrégats.

Le choix des fluorophores utilisés a une importance capitale. Un maximum de 4 fluorophores peut être passé en MCBL (quadruple marquage), pour plusieurs raisons. D'une part, l'augmentation du nombre de fluorophores augmente le temps d'acquisition et donc le risque de photo-blanchiment au cours de l'acquisition. D'autre part, l'acquisition simultanée de plusieurs fluorophores expose à un risque de *crosstalk* (recouvrement des spectres d'émission - *cross-emission* - et d'excitation - *cross-excitation* - des fluorophores) et de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfert* : quand le spectre d'émission d'un fluorophore tombe dans le spectre d'excitation d'un autre fluorophore situé à proximité alors l'énergie d'émission du premier fluorophore est transférée par résonance au second fluorophore et agit comme énergie d'excitation entraînant une réduction de l'intensité de la première émission et une augmentation de la deuxième). Ces deux phénomènes peuvent être responsables d'erreurs d'interprétation.

Il faut choisir des fluorophores de longueurs d'ondes d'excitation et d'émission se recouvrant le moins possible. Les fluorophores sélectionnés ici sont : DAPI, Alexa fluor 488, TRITC, Alexa fluor 568 et Alexa fluor 647 (**Table 2**). Ils peuvent être utilisés simultanément à l'exception de la Phalloïdine-TRITC et de l'Alexa fluor 568 dont les spectres se recouvrent.

Les fluorophores Alexa fluor sont privilégiés (plutôt que les Atto) car ils ont une forte émission de fluorescence, un photo-blanchiment faible et un spectre d'excitation et d'émission étroit les rendant très utiles en cas de double ou triple marquage [4,5].

Concernant les éléments ciblés, certains étaient déjà ciblés dans le protocole princeps [2] : L'ADN nucléaire par le DAPI, l'actine du cytosquelette par la Phalloïdine-TRITC (la phalloïdine est un agent intercalant du cytosquelette d'actine, présente dans toutes les cellules, et tout particulièrement dans les stéréocils des cellules ciliées [6]), et les neurones par les anticorps anti-neurofilament 200 kDa.

D'autres sous-unités cellulaires ont été ciblées permettant d'améliorer la spécificité de l'immunofluorescence:

- La parvalbumine : protéine liant le calcium présente principalement dans les cellules ciliées et dans les neurones [7].
- La protéine CtBP2 (*Carboxy-terminal Binding Protein 2*) : répresseur transcriptionnel faisant partie du ruban pré-synaptique des cellules ciliées internes [8]. Celle-ci n'a un intérêt qu'on fort grossissement.

Bien sûr, d'autres sous-unités cellulaires peuvent également être ciblées : par exemple myosine VIIA (présente dans les cellules ciliées [9]) et prestine (présente dans les cellules ciliées externes, c'est la protéine motrice responsable de l'électromotilité de l'amplificateur cochléaire [10]).

L'acquisition du volume d'une cochlée entière est techniquement difficile pour plusieurs raisons : (1) l'objectif de plus faible grossissement dont nous disposons (10x) ne permettait pas d'imager la cochlée sur toute sa largeur au niveau du tour basal (nécessitant la réalisation de mosaïques), (2) une acquisition sur toute la hauteur de l'échantillon (1,5 à 2 mm) nécessite un temps de plus de 7 heures, (3) il existe un photo-blanchiment des fluorophores compte tenu du temps d'acquisition et du nombre de passages nécessaire, (4) les

zones les plus éloignées de l'objectif renvoient beaucoup moins de fluorescence par photo-blanchiment, mais aussi du fait du passage de toute l'épaisseur de l'échantillon par les rayons laser responsable tout de même d'une diffraction (la clarification de l'échantillon n'étant, bien entendu, pas absolue).

Ainsi, le protocole actuel est optimisé sur le plan quantitatif et qualitatif mais reste complexe et long à réaliser. Cependant il présente vraiment l'intérêt d'observer la cochlée entière sans la disséquer avec des résultats tout à fait satisfaisant.

#### **4. Conclusion**

Le protocole d'immunofluorescence sur cochlée de gerbille de Mongolie, entière et transparente proposé en détail ici est optimisé et simplifié afin de permettre à un maximum d'équipes de se l'approprier.

#### **Conflit d'intérêt**

Aucun

## Références

- [1] MacDonald GH, Rubel EW. Three-dimensional imaging of the intact mouse cochlea by fluorescent laser scanning confocal microscopy. *Hear Res* 2008;243:1–10. doi:10.1016/j.heares.2008.05.009.
- [2] Risoud M, Sircoglou J, Dedieu G, Tardivel M, Vincent C, Bonne N-X. Imaging and cell count in cleared intact cochlea in the Mongolian gerbil using laser scanning confocal microscopy. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* 2017;134:221–4. doi:10.1016/j.anorl.2017.01.001.
- [3] Vogt RV, Phillips DL, Omar Henderson L, Whitfield W, Spierto FW. Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. *J Immunol Methods* 1987;101:43–50. doi:10.1016/0022-1759(87)90214-6.
- [4] Dumitriu D, Rodriguez A, Morrison JH. High-throughput, detailed, cell-specific neuroanatomy of dendritic spines using microinjection and confocal microscopy. *Nat Protoc* 2011;6:1391–411. doi:10.1038/nprot.2011.389.
- [5] Claxton NS, Fellers TJ, Davidson MW. *Laser Scanning Confocal Microscopy*. Department of Optical Microscopy and Digital Imaging, The Florida State University, Tallahassee, Florida; 2006.
- [6] Tilney LG, Tilney MS. Functional organization of the cytoskeleton. *Hear Res* 1986;22:55–77.
- [7] Heller S, Bell AM, Denis CS, Choe Y, Hudspeth AJ. Parvalbumin 3 is an Abundant Ca<sup>2+</sup> Buffer in Hair Cells. *JARO - J Assoc Res Otolaryngol* 2002;3:488–98. doi:10.1007/s10162-002-2050-x.
- [8] Khimich D, Nouvian R, Pujol R, Tom Dieck S, Egner A, Gundelfinger ED, et al. Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature* 2005;434:889–94. doi:10.1038/nature03418.
- [9] Hasson T, Heintzelman MB, Santos-Sacchi J, Corey DP, Mooseker MS. Expression in cochlea and retina of myosin VIIa, the gene product defective in Usher syndrome type 1B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9815–9.
- [10] Zheng J, Shen W, He DZZ, Long KB, Madison LD, Dallos P. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 2000;405:149–55. doi:10.1038/35012009.

*Table 1 : Protocole d'immunofluorescence et clarification sur cochlée entière*

<b>Etape</b>	<b>Description</b>	<b>Durée</b>
<b>Fixation</b>		<b>1 jour</b>
Microdissection	Ablation des tissus osseux en excès, de l'artère stapédienne, et de l'étrier. Ouverture de la fenêtre ronde et confection d'un petit trou de trépan à l'apex cochléaire (hélicotrème).	
Fixation	Perfusion douce par PFA 4% en PBS 1X.	
Microdissection	Ablation des éventuels tissus en excès restant, élargissement de l'orifice à l'apex, et confection d'un autre trou au niveau du tour basal pour favoriser la circulation des réactifs.	
Post-fixation	Immersion en PFA 4% en PBS 1X à 4 ° C pendant 22h.	
<b>Décalcification</b>		<b>6 jours</b>
Rinçage	Immersion 3 fois 30min en PBS 1X.	
Décalcification	Immersion en EDTA 10% en PBS 1X à 4 ° C pendant 6 jours.	
Rinçage	Immersion 3 fois 30min en PBS 1X.	
Conservation	Conservation en éthanol 70% à 4 ° C jusqu'à utilisation ultérieure (non systématique).	
<b>Pré-traitement</b>		<b>7h30min</b>
Rinçage	Immersion 3 fois 30min en PBS 1X.	
Perméabilisation	Immersion 2h en PBS 1X + 0.5% Triton X-100.	
Blocage	Incubation 4h en solution de blocage (PBSGT) : PBS 1X + 0,2% Gélatine + 0,5% Triton X-100.	
<b>Immunomarquage</b>		<b>42 heures</b>
Anticorps primaires	Incubation avec anticorps primaires en solution de blocage (PBSGT) pendant 24h à 4 ° C.	
Rinçage	Immersion 3 fois 1h en PBS 1X.	
Anticorps secondaires	Incubation avec anticorps secondaires en solution de blocage (PBSGT) + DAPI ± Phalloïdine-TRITC pendant 12h, à 4 ° C à l'abri de la lumière.	
Rinçage	Immersion 3 fois 1h en PBS 1X, à l'abri de la lumière.	
<b>Déshydratation et clarification</b>		<b>23 heures</b>
Déshydratation	Bains successifs en éthanol de concentration croissante : 70%, 90% et éthanol absolu de 2h chacun, à l'abri de la lumière.	
Clarification	Immersion en MSBB mélangé à de l'éthanol absolu (1:1) pendant 4h, puis 2 bains successifs de MSBB pendant 1h puis 12h, à l'abri de la lumière.	
<b>Montage</b>		<b>5 minutes</b>
Montage	Sur lamelle iBidi avec immersion en MSBB.	

---

*PFA = Paraformaldéhyde ; PBS = Phosphate Buffered Saline ; EDTA = EthyleneDiamine Tetraacetic Acid ; PBSGT = PBS 1X + 0,2% Gélatine + 0,5% Triton X-100 ; DAPI = 4',6 Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride ; Phalloïdine-TRITC = Phalloïdine-Tetramethylrhodamine Isothiocyanate ; MSBB : Méthyl-Salycilate (5 parts) et Benzoate de Benzyl (3 parts). Toutes les étapes sont réalisées dans des flacons en verre de 10 mL, en agitation douce (30 tours par minutes) à température ambiante sauf mention contraire. Les volumes de produits utilisées sont de 5 mL (sauf pour les solutions d'anticorps : 2 mL).*

**Table 2 :** Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des différents fluorophores utilisés.

Fluorophore	Longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{ex}$ )	Longueur d'onde d'émission ( $\lambda_{em}$ )	Couleur du spectre d'émission
Complexe DAPI-ADN	364 nm	454 nm	Violet-Bleu
Alexa fluor 488	495 nm	519 nm	Vert
Phalloïdine-TRITC	540-545 nm	570-573 nm	Jaune
Alexa fluor 568	578 nm	603 nm	Orange-Rouge
Alexa fluor 647	650 nm	668 nm	Rouge lointain- Infrarouge

*DAPI* = 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride ; *ADN* = Acide désoxyribonucléique ; *TRITC* = Tetraméthylrhodamine B isothiocyanate. On rappelle que le spectre de la lumière visible s'étend de 400 à 700 nm (ultraviolets en deçà, infrarouges au-delà).

**Figure 1 : La même cochlée gauche à différentes étapes du protocole de clarification.** A) Juste après prélèvement. B) Après décalcification. C) Après clarification, à l'air libre (aspect comme du verre). D) Après clarification, immergée dans le MSBB= Méthyl-Salicylate et Benzoate de Benzy (aspect transparent avec bonne visualisation des trois tours de spire de la cochlée). Sont indiqués l'apex cochléaire (tête de flèche), la fenêtre ronde (flèche) et la fenêtre ovale (étoile). Stéréomicroscope, oculaire 10X et grossissement  $\times 1$ . Echelle = 1 mm.

**Figure 2 : Immunofluorescence sur organe de Corti à faible (1) et à fort grossissement (2) :**  
A) Marquage nucléaire par le DAPI (4',6-Diamidino-2-phénylindole dihydrochloride) (bleu),  
B) Marquage de l'actine par la Phalloïdine (vert). En B1, On visualise nettement la touffe ciliaire des cellules ciliées internes (cercle) et externes en forme de V (carré). On constate également que les cellules ciliées internes et externes ont des axes perpendiculaires. C) Marquage des neurofilaments (rouge), D) Marquage de la protéine Carboxy-terminal Binding Protein 2 (CtBP2) du ruban pré-synaptique (cyan) qui nécessite un fort grossissement (D2) pour être visualisée. E) Image de fusion avec représentation en pointillés de la forme d'une cellule ciliée interne. Microscopie confocale à balayage laser. Objectif 40X. Intensité Maximale de Projection. Echelle = 10  $\mu\text{m}$  (1) et 5  $\mu\text{m}$  (2).

**Figure 3 : Immunofluorescence sur un tour apical de cochlée.** A) Marquage nucléaire par le DAPI (bleu). B) Marquage de l'actine par la Phalloïdine (vert). C) Marquage des cellules ciliées par la Parvalbumine (rouge), on constate que les cellules ciliées internes ont un axe perpendiculaire à celui des cellules ciliées externes. D) Image de fusion avec rendu volumique. La zone délimitée en pointillés correspond à un traumatisme de la membrane basilaire lors de la microdissection de la cochlée (confection du trou de trépan à l'apex cochléaire et perfusion). Les flèches indiquent quelques zones où manquent des cellules ciliées externes. DAPI = 4',6-Diamidino-2-phénylindole dihydrochloride. Microscopie



*confocale à balayage laser. Objectif 10X. Intensité Maximale de Projection. Echelle = 100  $\mu$ m.*

***Figure 4 : La même cochlée imagée pour ses tours basal (A), médian (B) et apical (C et D) dans différentes positions (cochlée posée sur la base pour A, B et C ; cochlée posée sur l'apex pour D) avec 1) DAPI en bleu, 2) Phalloïdine en vert, 3) Neurofilament en rouge, 4) Parvalbumine en cyan, 5) Image de fusion. On constate que le tour apical imagé par la base (C) apparaît peu brillant comparé au tour apical imagé par l'apex (D). De la même manière, le tour moyen (B) est moins brillant que le tour basal (A) quand les rayons lasers passent par la base. Ces deux constatations s'expliquent par l'épaisseur de tissu à traverser par les rayons. DAPI = 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride. Microscopie confocale à balayage laser. Objectif 10X. Intensité Maximale de Projection. Echelle = 100  $\mu$ m.***







