



Le système auditif face à ses agresseurs

- 06 février 2014 **COURS** : Les agresseurs du système auditif : son, xénobiotiques, vieillissement... Aspects génétiques de la susceptibilité individuelle à ces agresseurs
SÉMINAIRE : Prédispositions génétiques aux maladies communes : de la causalité aux facteurs de prédisposition en interaction avec l'environnement
Jean-Louis Mandel, *IGBMC, université Louis Pasteur, Strasbourg*
- 06 mars 2014 **COURS** : Le métabolisme de l'oxygène et la toxicité des espèces oxygénées activées, plaque tournante de l'action de nombreux agresseurs
SÉMINAIRE : Détection hors fréquence et réponses cochléaires fantômes
Paul Avan, *laboratoire de biophysique sensorielle, université d'Auvergne, Clermont-Ferrand*
- 13 mars 2014 **COURS** : Détecteurs et effecteurs du stress oxydant : rôles dans le métabolisme et la signalisation. Le dialogue des organelles : la part des peroxysomes.
SÉMINAIRE : Les antibiotiques sont-ils autodestructeurs ?
Patrice Courvalin, *unité des agents antibactériens, institut Pasteur, Paris*
- 20 mars 2014 **COURS** : Les moyens de défense : prévention et traitement
SÉMINAIRE : Acouphènes subjectifs : physiopathologie et éléments d'une prise en charge rationnelle
Alain Londero, *Service ORL et CCF, hôpital Georges Pompidou, Paris*

2^{ème} cours : 6 mars 2014

Le métabolisme de l'oxygène et la toxicité des espèces oxygénées activées, plaque tournante de l'action de nombreux agresseurs.

Séminaire:

Paul Avan – Laboratoire de Biophysique sensorielle, Faculté de Médecine, Université d’Auvergne, Clermont-Ferrand

“Détection hors fréquence et réponses cochléaires fantômes”

PLAN du COURS

- les espèces réactives de l'oxygène (EROS... ROS):

- la signalisation redox

Aspects biochimiques

- le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂): formation, dégradation, modes de transduction du signal (SH \rightleftharpoons S-S :thiol disulfide)

Aspects cellulaires

- impacts
 - 1) A-la signalisation via des récepteurs, B- la transcription (facteurs de transcription et épigénèse) C- élimination des protéines mal repliées (misfolding)
 - 2) méthodes de détection des agents de la signalisation REDOX . D- la signalisation à distance: le dialogue mitochondrie-RER et la motilité des organelles (mitochondrie) comme modulateur de la signalisation redox.

- homéostasie redox et atteintes héréditaires de l'audition

Formes monogéniques de surdité: GRXCR1 (domaine de type GRX-like: *DFNB25, Pirouette*)
Miner-1 (protéine 2Fe2S le syndrome de Wolfram)

Presbyacousie: GST1 et GST2 (glutathion transférases) les modèles animaux de presbyacousie

Qu'est-ce qu'un radical libre ?

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire (non apparié).

Radicaux libres centrés sur l'oxygène

$\text{O}_2^{\cdot -}$: radical superoxyde

HO_2^{\cdot} : radical perhydroxyle

$\cdot\text{OH}$: radical hydroxyle

RO_2^{\cdot} : radical peroxyde

RO^{\cdot} : radical alkoxyde

oxygène
moléculaire

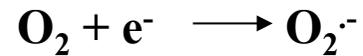


anion
superoxyde



Production de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ (anion superoxyde)

- réduction de l'oxygène moléculaire dans la mitochondrie (complexe I) et complexe III (ubiquinone ou coenzyme A)

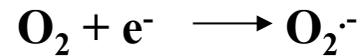


- NADPH oxydases (**NOX** et DUOX) membrane plasmique et RE ..NOX complexe



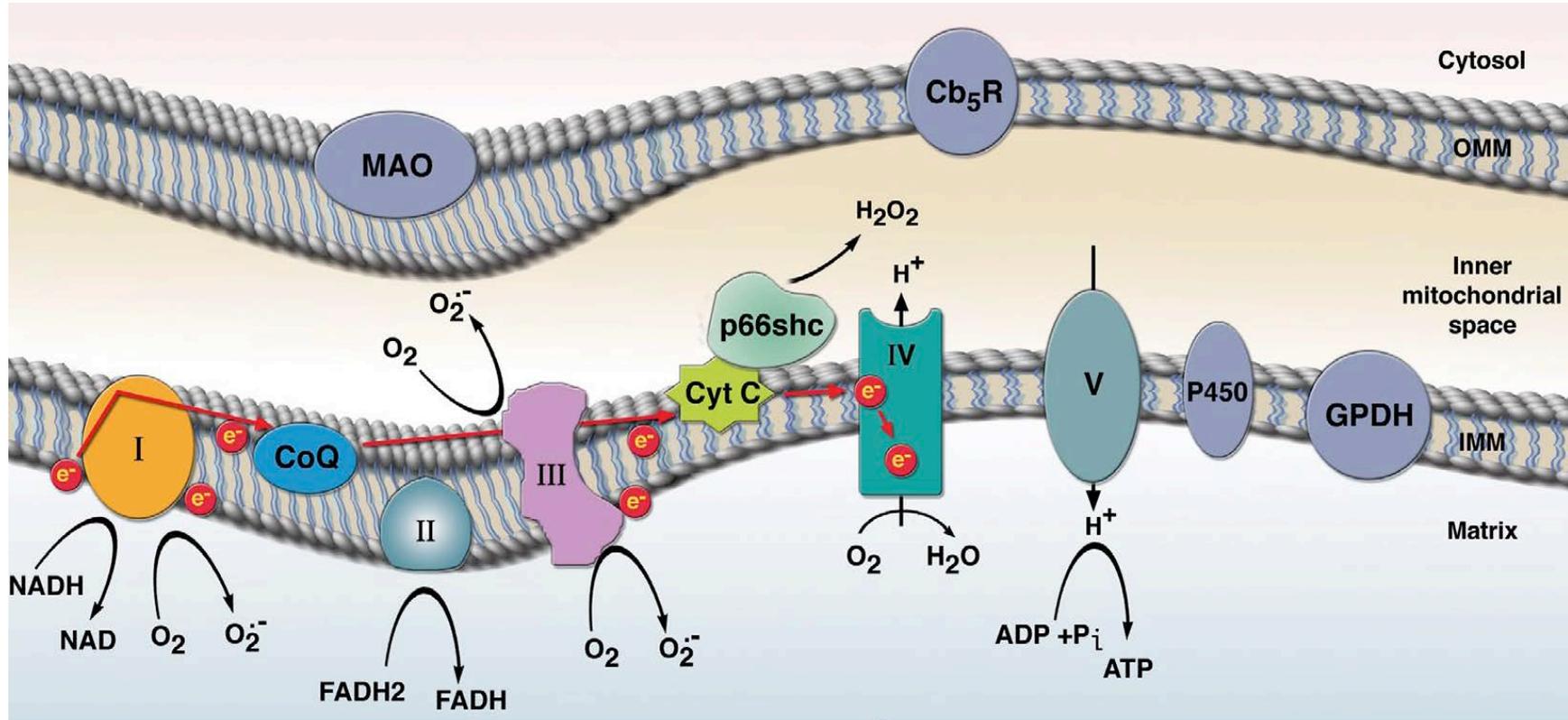
Production de l' $O_2^{\cdot-}$ (anion superoxyde)

- réduction de l'oxygène moléculaire dans la mitochondrie (complexe I) et complexe III (ubiquinone ou coenzyme A)

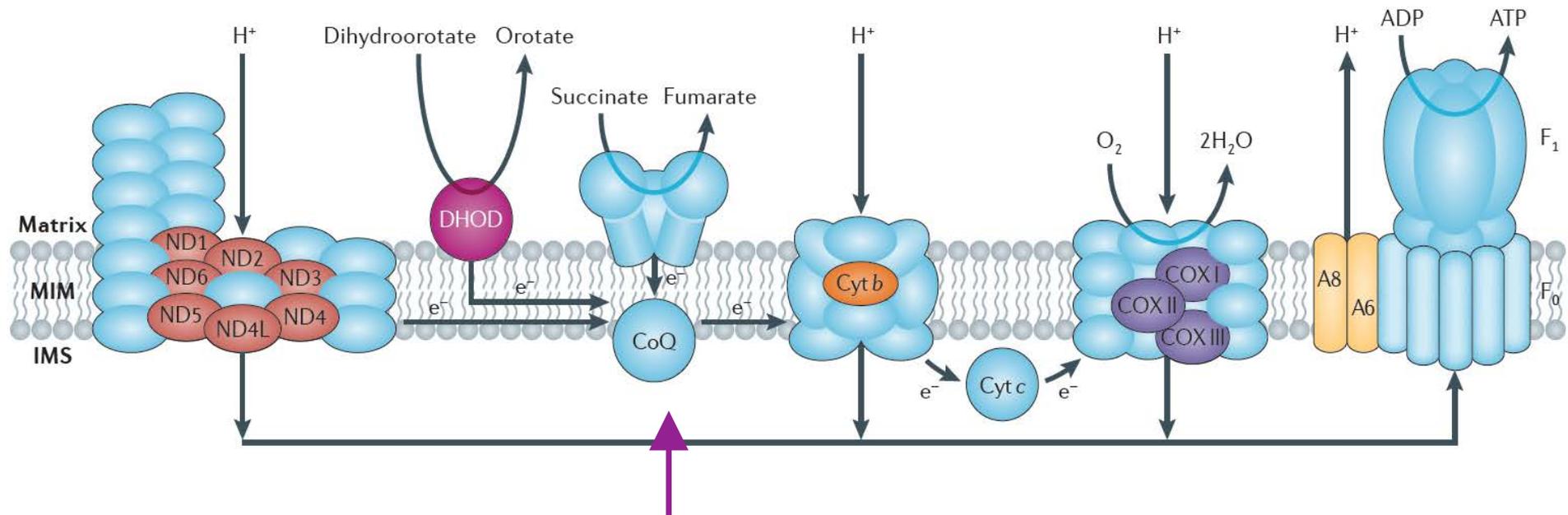


- NADPH oxydases (**NOX** et DUOX) membrane plasmique et RE ..NOX complexe





Oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes

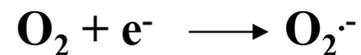


Polypeptides	Complex I	Complex II	Complex III	Complex IV	Complex V
mtDNA-encoded subunits	7	0	1	3	2
nDNA-encoded subunits	~39	4	10	10	~14
Assembly proteins	~11	~2	~9	~30	~3

Production de l' $O_2^{\cdot-}$ (anion superoxyde)

Réduction de l'oxygène moléculaire

- Dans la **mitochondrie** au niveau des complexes I et III (ubiquinone ou coenzyme A)



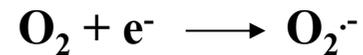
- NADPH oxydases (**NOX** et **DUOX**) **membrane plasmique et RE** ..NOX complexe



Production de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ (anion superoxyde)

Réduction de l'oxygène moléculaire

- **capture d'électrons par l'oxygène moléculaire (non enzymatique)**: dans la **mitochondrie** au niveau des **complexes I et III** (ubiquinone ou coenzyme A)



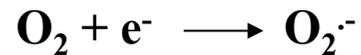
- **au cours d'oxydation par les NADPH oxydases (NOX et DUOX)**
membrane plasmique et RE ..NOX complexe



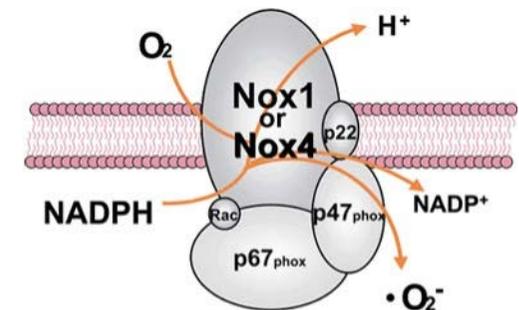
Produire de l' $O_2^{\cdot-}$ (anion superoxyde)

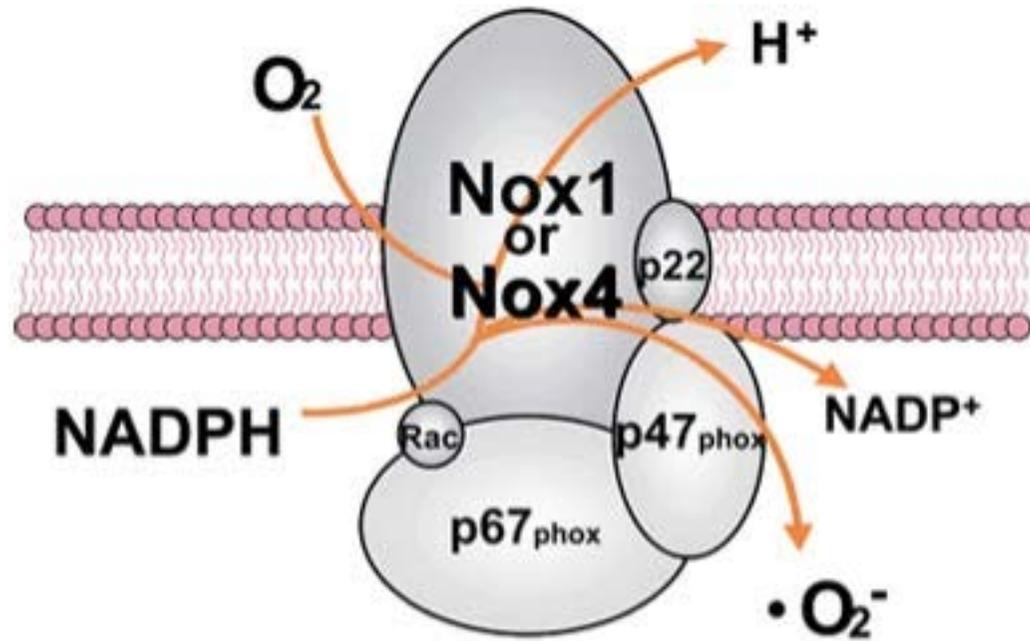
Réduction de l'oxygène moléculaire

- **capture d'électrons par l'oxygène moléculaire (non enzymatique)**: dans la **mitochondrie** au niveau des **complexes I et III** (ubiquinone ou coenzyme A)



- **au cours de l'oxydation par les NADPH oxydases (NOX et DUOX) membrane plasmique et RE** ..NOX complexe





Production d'H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène, eau oxygénée)

- dismutation de l'anion superoxyde: superoxyde dismutases: **SODs**

Elles sont de 3 types: **cytoplasmique**, SOD1, contient dans son site actif du cuivre et du zinc (Cu,ZnSOD); **mitochondriale**, SOD2, contient dans son site actif du manganèse (MnSOD); extra-cellulaire, SOD3 (Cu,ZnSOD).



-oxydation des acides gras à très longues chaînes ou branchés dans le **peroxysome**:

-multiples oxydases:

Enzymes in peroxisomes that generate ROS

Enzyme	Substrate	ROS
(1) Acyl-CoA oxidases		
(a) Palmitoyl-CoA oxidase	Long chain fatty acids	H ₂ O ₂
(b) Pristanoyl-CoA oxidase	Methyl branched chain fatty acids	H ₂ O ₂
(c) Trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase	Bile acid intermediates	H ₂ O ₂
(2) Urate oxidase	Uric acid	H ₂ O ₂
(3) Xanthine oxidase	Xanthine	H ₂ O ₂ , O ₂ ^{•-}
(4) D-amino acid oxidase	D-Proline	H ₂ O ₂
(5) Pipecolic acid oxidase	L-pipecolic acid	H ₂ O ₂
(6) D-aspartate oxidase	D-aspartate, N-methyl-D-aspartate	H ₂ O ₂
(7) Sarcosine oxidase	Sarcosine, pipecolate	H ₂ O ₂
(8) L-alpha-hydroxy acid oxidase	Glycolate, lactate	H ₂ O ₂
(9) Poly amine oxidase	N-Acetyl spermine/ spermidine	H ₂ O ₂

- **xanthine oxydase (cytoplasme)**



- **monoamine oxydase** (catabolisme de la serotonine) (**mitochondrie**)

Production d' H₂O₂ (peroxyde d' hydrogène, eau oxygénée)

- dismutation de l' anion superoxyde: superoxyde dismutases: SODs

Elles sont de 3 types: **cytoplasmique**, SOD1, contient dans son site actif du cuivre et du zinc (Cu,ZnSOD) ; **mitochondriale**, SOD2, contient dans son site actif du manganèse (MnSOD); extra-cellulaire, SOD3 (Cu,ZnSOD).

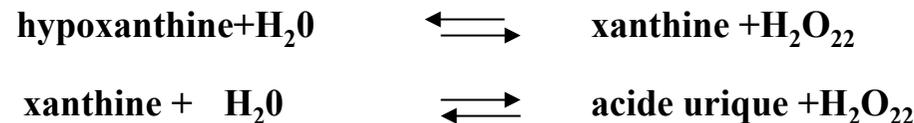


- oxydation

- **des acides gras à très longues chaînes ou branchés** dans le **peroxysome**

(avec plusieurs autres oxydases dans cet organelle)

- **de la xanthine et l' hypoxanthine**: xanthine et hypoxanthine oxydase (**cytoplasme**, **peroxysomes**(*xanthine oxydase*))



-**des monoamines**: monoamine oxydase (catabolisme de la serotonine) (**mitochondrie**)

Enzymes in peroxisomes that generate ROS

Enzyme	Substrate	ROS
(1) Acyl-CoA oxidases		
(a) Palmitoyl-CoA oxidase	Long chain fatty acids	H ₂ O ₂
(b) Pristanoyl-CoA oxidase	Methyl branched chain fatty acids	H ₂ O ₂
(c) Trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase	Bile acid intermediates	H ₂ O ₂
(2) Urate oxidase	Uric acid	H ₂ O ₂
(3) Xanthine oxidase	Xanthine	H ₂ O ₂ , O ₂ ^{•-}
(4) D-amino acid oxidase	D-Proline	H ₂ O ₂
(5) Pipecolic acid oxidase	L-pipecolic acid	H ₂ O ₂
(6) D-aspartate oxidase	D-aspartate, N-methyl-D-aspartate	H ₂ O ₂
(7) Sarcosine oxidase	Sarcosine, pipecolate	H ₂ O ₂
(8) L-alpha-hydroxy acid oxidase	Glycolate, lactate	H ₂ O ₂
(9) Poly amine oxidase	N-Acetyl spermine/ spermidine	H ₂ O ₂

Produire de l' H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène, eau oxygénée)

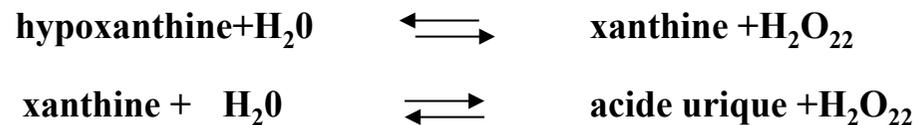
- **dismutation de l'anion superoxyde**: superoxyde dismutases: **SODs**
cytoplasmique, mitochondriale, peroxysome, extra-cellulaire.



- **oxydation**

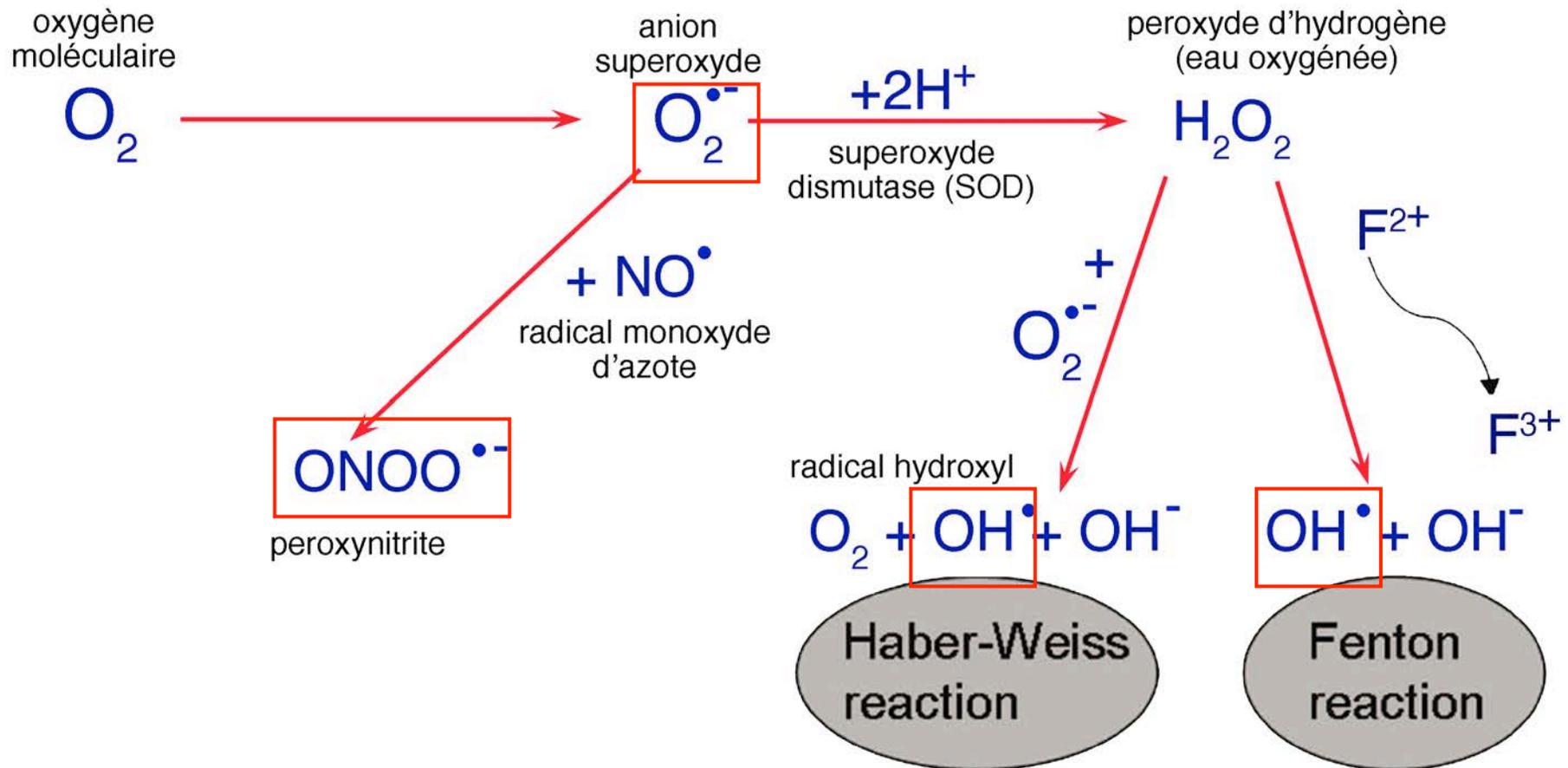
- **des acides gras à très longues chaînes ou branchés** dans le **peroxysome**
(avec plusieurs autres oxydases dans cet organelle)

- **de la xanthine et l'hypoxanthine**:
xanthine et hypoxanthine oxydase (**cytoplasme, peroxysomes**(*xanthine oxydase*))



- **des monoamines**: monoamine oxydase (catabolisme de la serotonine) (**mitochondrie**)

Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote



Production d' H₂O₂ (peroxyde d' hydrogène, eau oxygénée)

- dismutation de l' anion superoxyde: superoxyde dismutases, SODs

Elles sont de 3 types: **cytoplasmique**, SOD1, contient dans son site actif du cuivre et du zinc (Cu,ZnSOD) ; **mitochondriale**, SOD2, contient dans son site actif du manganèse (MnSOD); **extra-cellulaire**, SOD3 (Cu,ZnSOD).

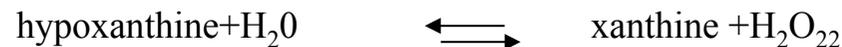


- oxydation des acides gras à très longues chaînes ou branchés dans le **peroxysome**:
- multiples oxydases:

Enzymes in peroxisomes that generate ROS

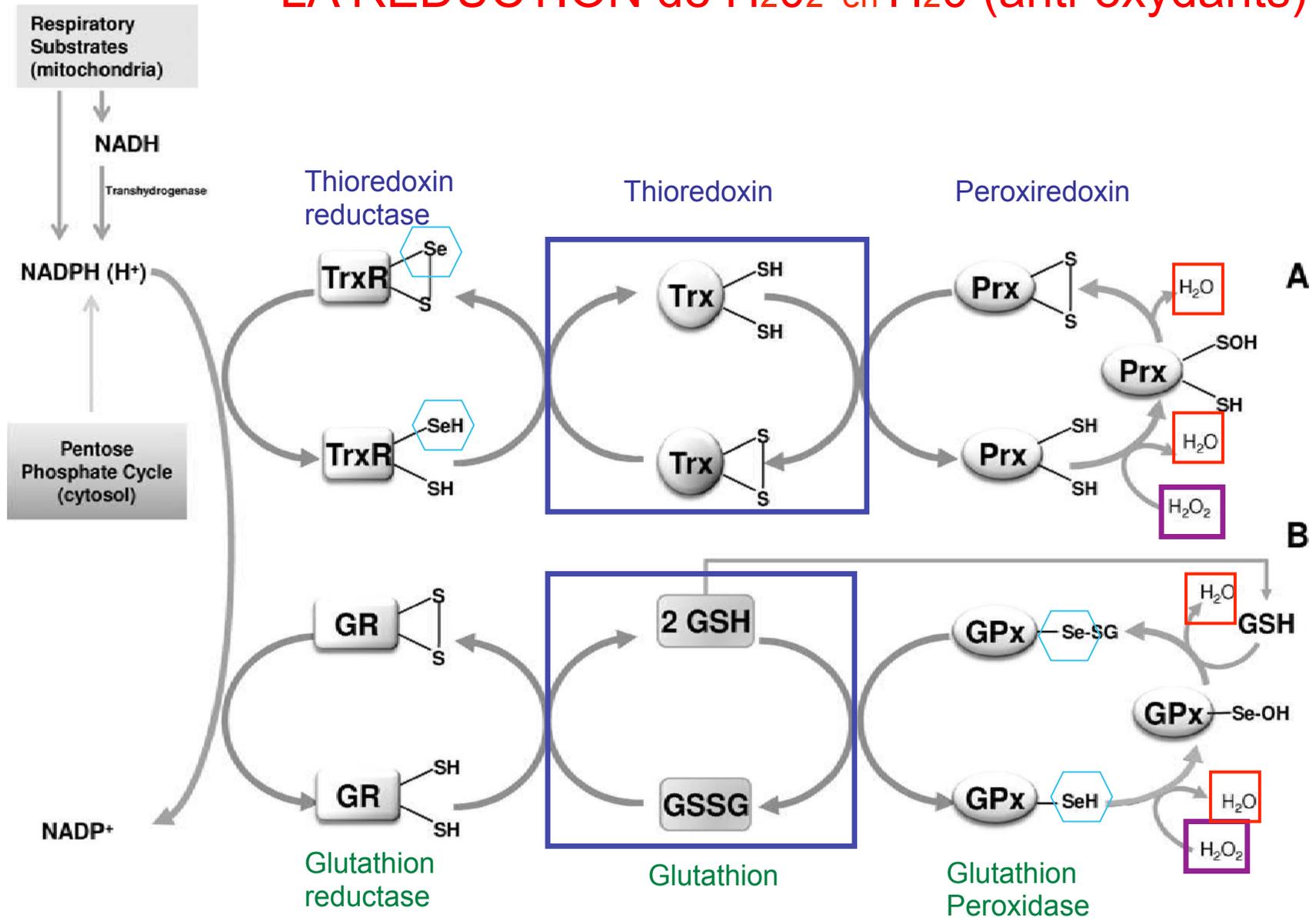
Enzyme	Substrate	ROS
(1) Acyl-CoA oxidases		
(a) Palmitoyl-CoA oxidase	Long chain fatty acids	H ₂ O ₂
(b) Pristanoyl-CoA oxidase	Methyl branched chain fatty acids	H ₂ O ₂
(c) Trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase	Bile acid intermediates	H ₂ O ₂
(2) Urate oxidase	Uric acid	H ₂ O ₂
(3) Xanthine oxidase	Xanthine	H ₂ O ₂ , O ₂ ^{•-}
(4) D-amino acid oxidase	D-Proline	H ₂ O ₂
(5) Pipecolic acid oxidase	L-pipecolic acid	H ₂ O ₂
(6) D-aspartate oxidase	D-aspartate, N-methyl-D-aspartate	H ₂ O ₂
(7) Sarcosine oxidase	Sarcosine, pipecolate	H ₂ O ₂
(8) L-alpha-hydroxy acid oxidase	Glycolate, lactate	H ₂ O ₂
(9) Poly amine oxidase	N-Acetyl spermine/ spermidine	H ₂ O ₂

- xanthine oxydase (**cytoplasme**)

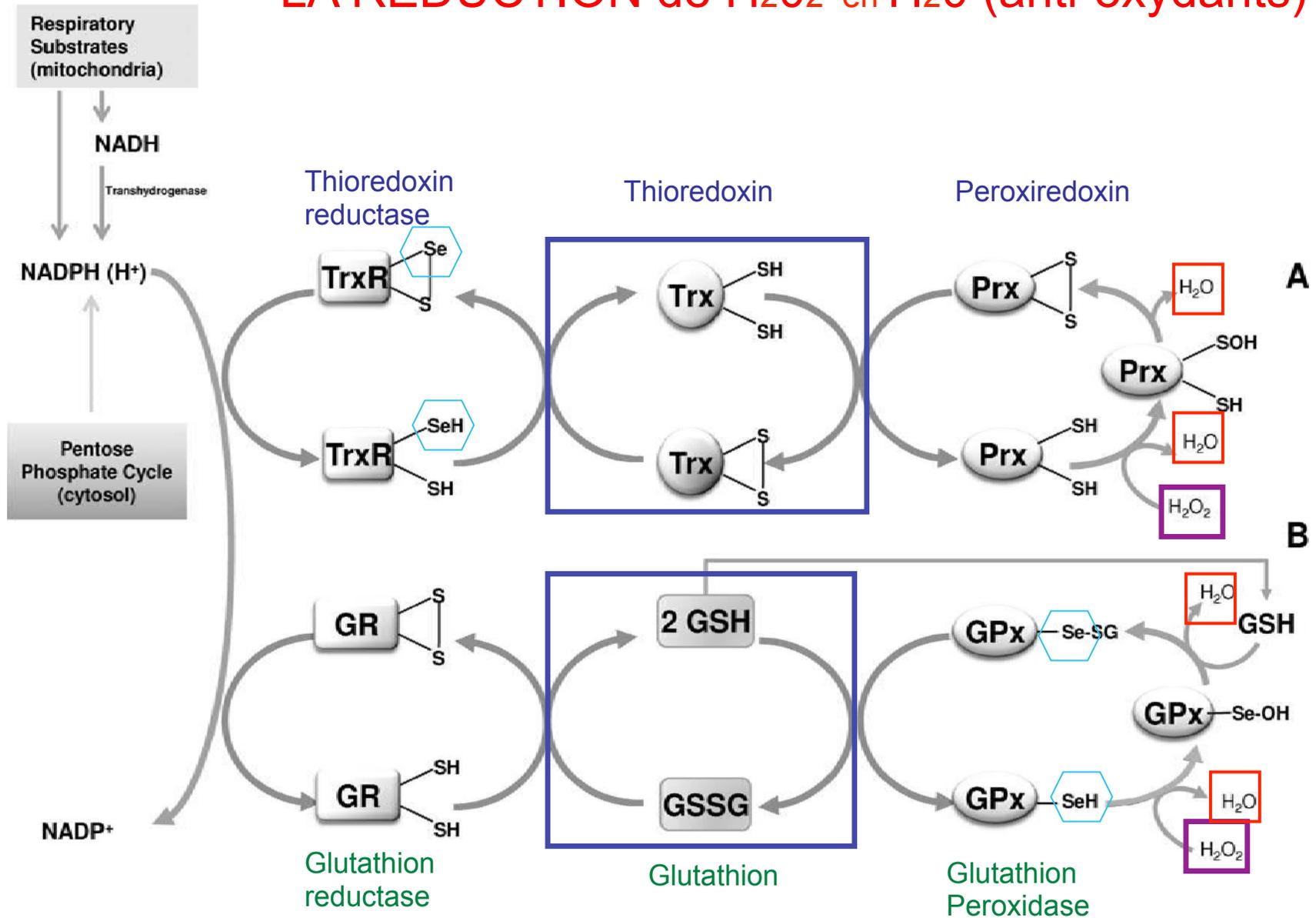


- monoamine oxydase (catabolisme de la serotonine) (**mitochondrie**)

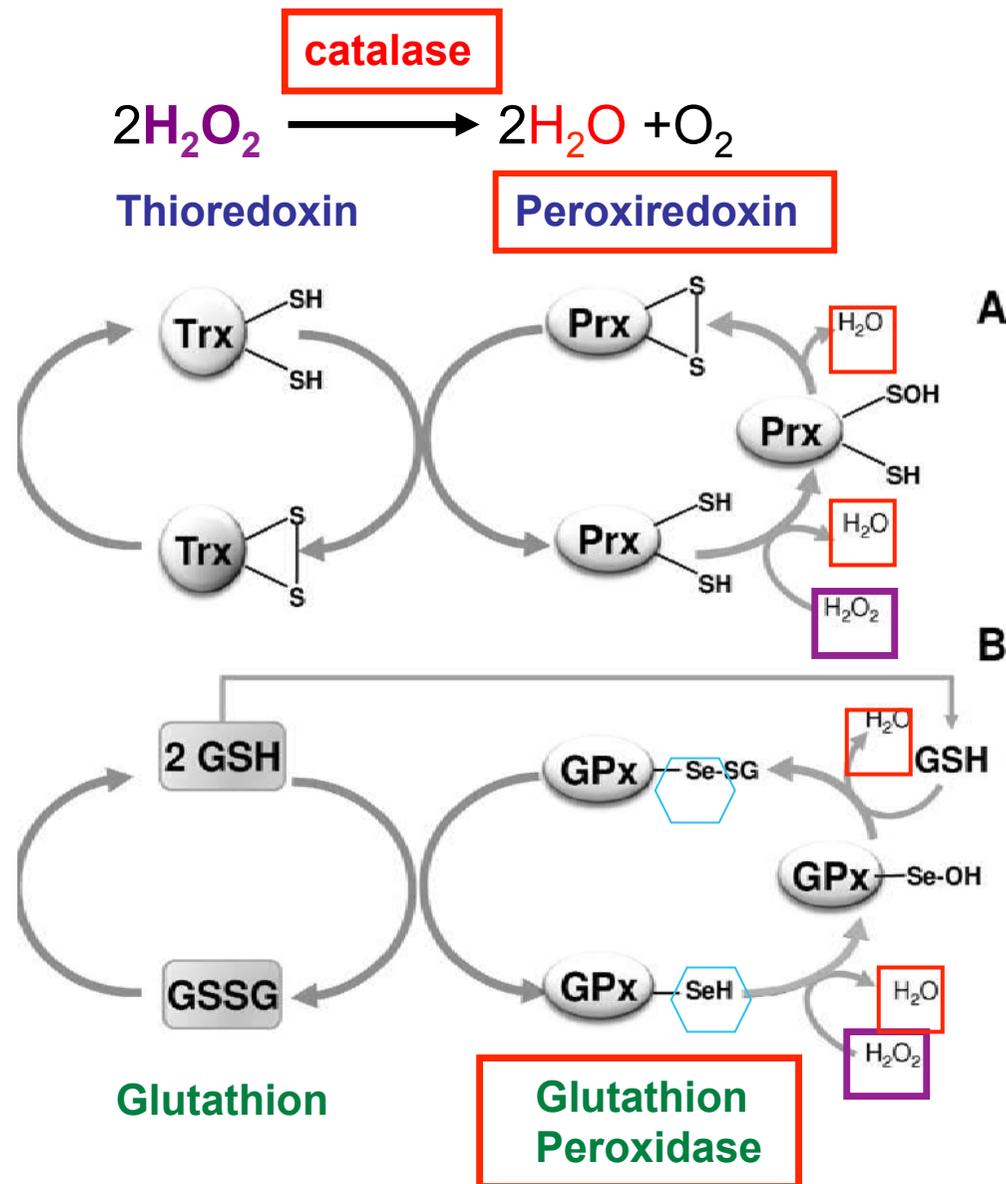
LA REDUCTION de H₂O₂ en H₂O (anti-oxydants)



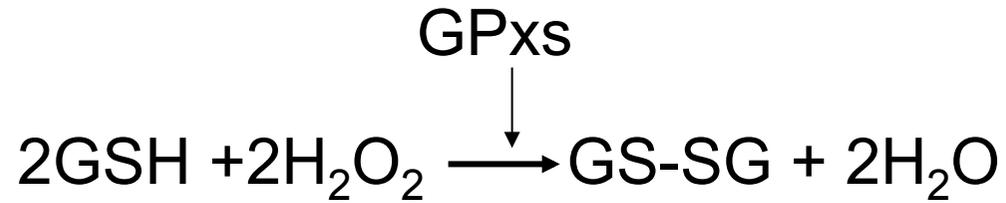
LA REDUCTION de H₂O₂ en H₂O (anti-oxydants)



REDUIRE l' H₂O₂ en H₂O (anti-oxydants)



Glutathion peroxydases (GPxs)



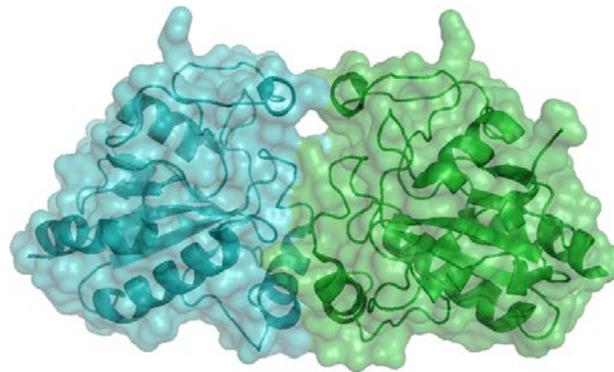
GPx1 à GPx8

GPx1 GPx1,2,3,4 et la GPx6 (chez l'homme mais pas la souris) contiennent du sélénium

GPx1= cytoplasmique, la plus abondante

GPx2= mitochondriale?

GPx3= extracellulaire



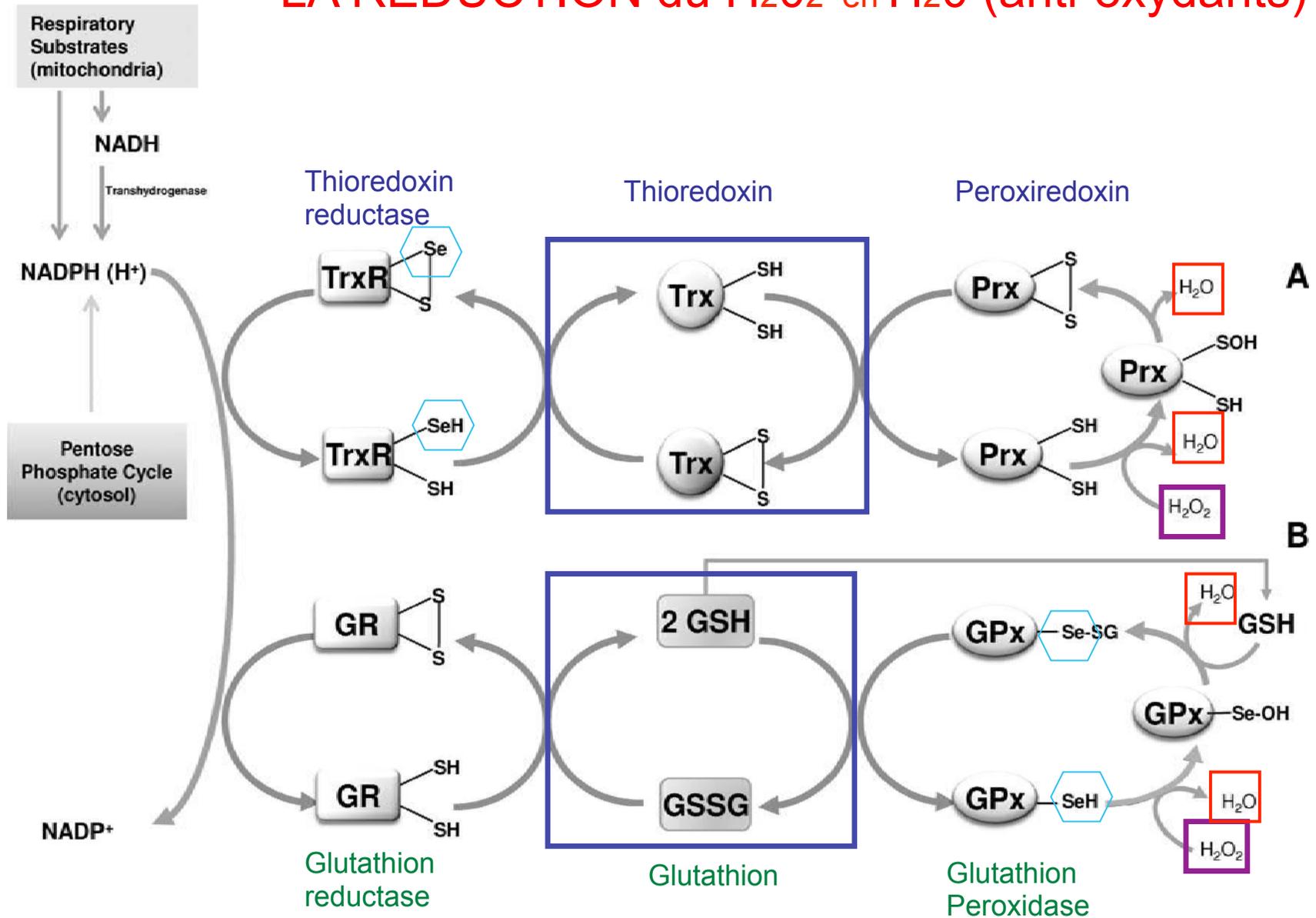
GLUTATHION

Cysteine

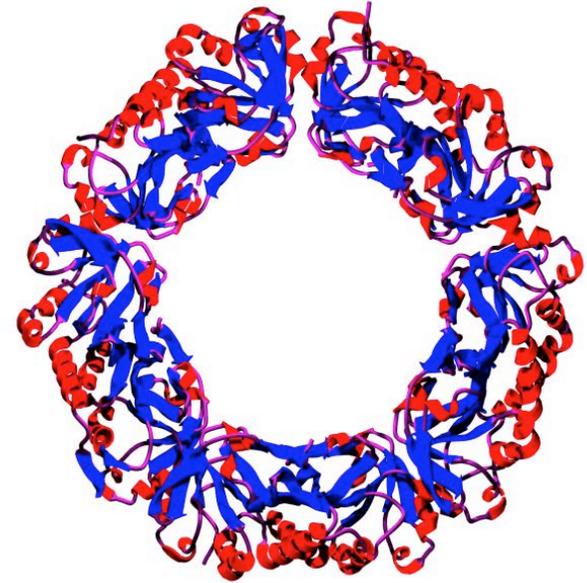
Acide glutamique

Glycine

LA REDUCTION du H₂O₂ en H₂O (anti-oxydants)



Peroxi-redoxines

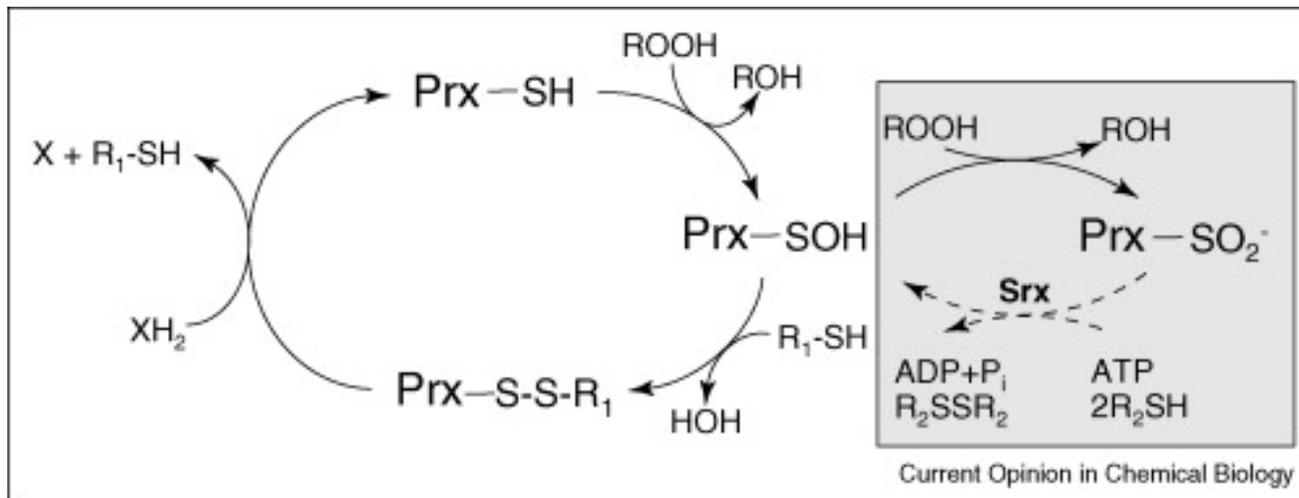


Prx oxydé est réduit par la Thioredoxine

Très exprimées; comportent le motif CXXC pour plusieurs d'entre elles

Sont régulées par phosphorylation, oxydo-réduction, oligomérisation

Inactivées par hyperoxydation, leur SH devient acide sulfénique qui peut retourner au stade SH sous l'action de la sulfiredoxine.



Enzyme dans sa forme acide sulfénique, Prx-SOH, est réduite par la sulfiredoxine (Srx).

Thioredoxines

Anti-oxydants majeurs. Petites enzymes redox; Elles facilitent la réduction des autres protéines, par l'échange, disulfide-thiol: $S-S \rightarrow 2SH$; elles ont quantité de cibles

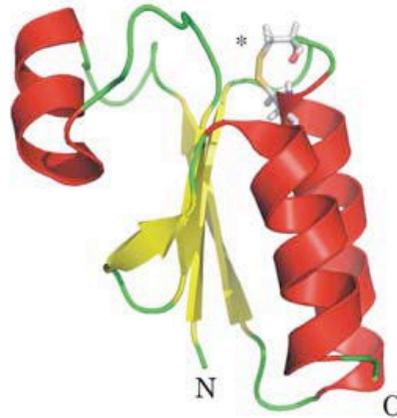
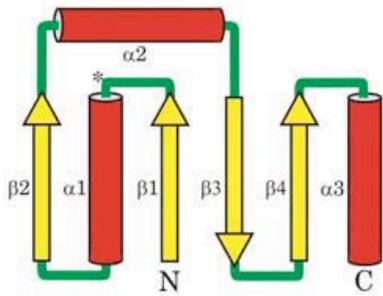
Existent dans tous les organismes vivants

Elles ont toutes la même structure 3D, très caractéristique

Leur site actif comporte toujours un thiol-disulfide

Elles comporte aussi un ou plusieurs motifs CXXC

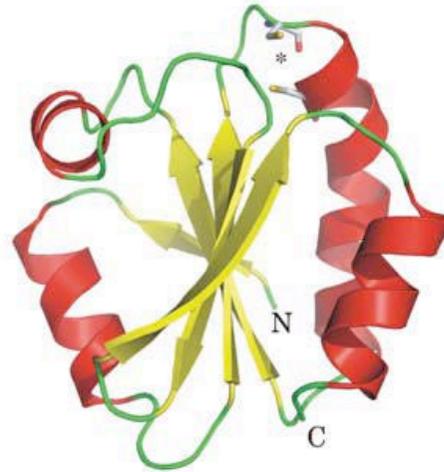
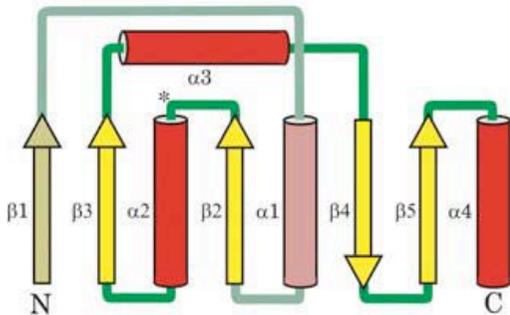
Elles sont maintenues réduites par une thioredoxine réductase qui est dépendante du NADPH

A

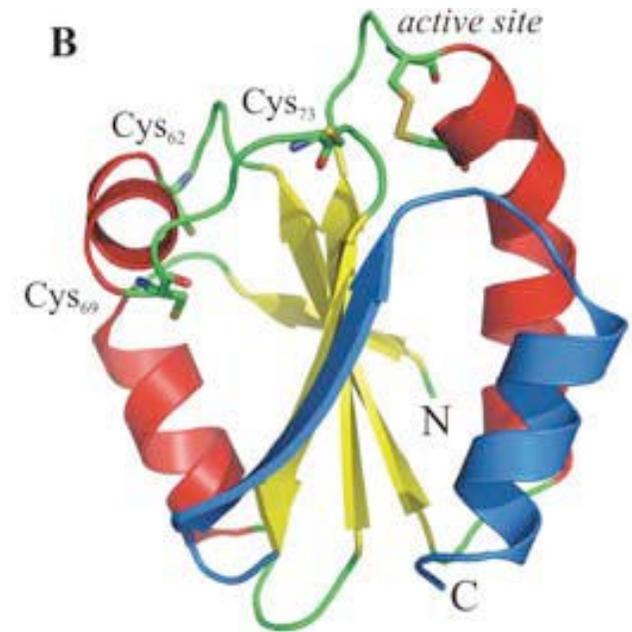
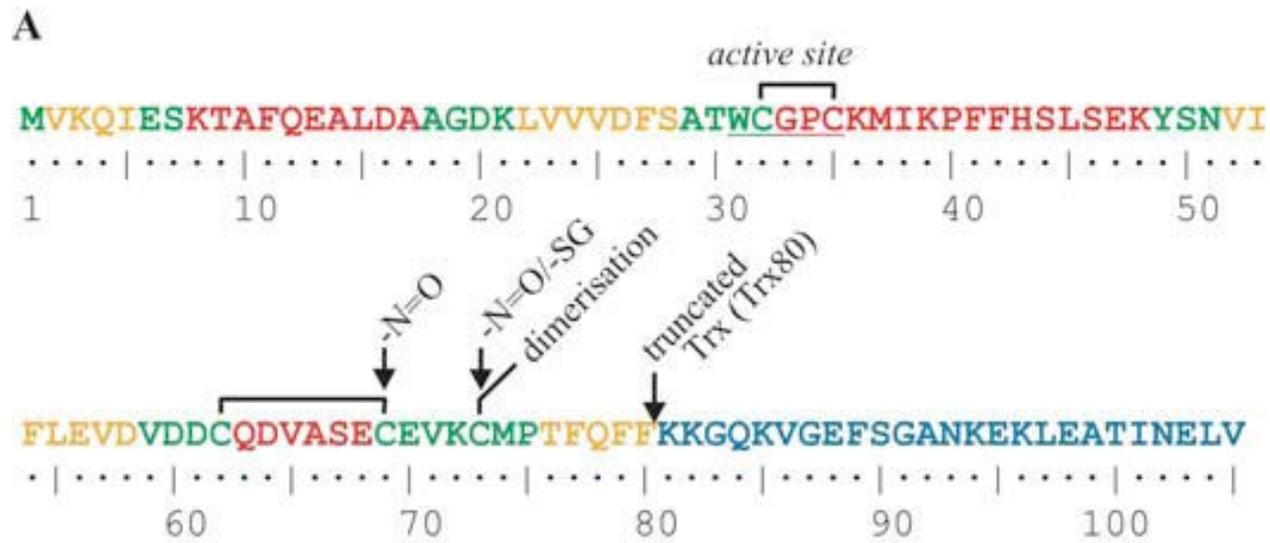
(A) The basic thioredoxin fold consists of a four stranded β -sheet and three surrounding α -helices (see Topology), which is adopted only by bacterial Grxs. The structure of oxidized E. coli Grx1 is shown (PDB code: 1EGO).

(B)

Trxs possess an additional β -helix and β -sheet at the N-terminus (see Topology). The structure of reduced human Trx1 is shown (PDB code: 1ERT). The positions of the characteristic Cys–X–X–Cys active site motifs are marked by asterisks.

B

The thioredoxin fold

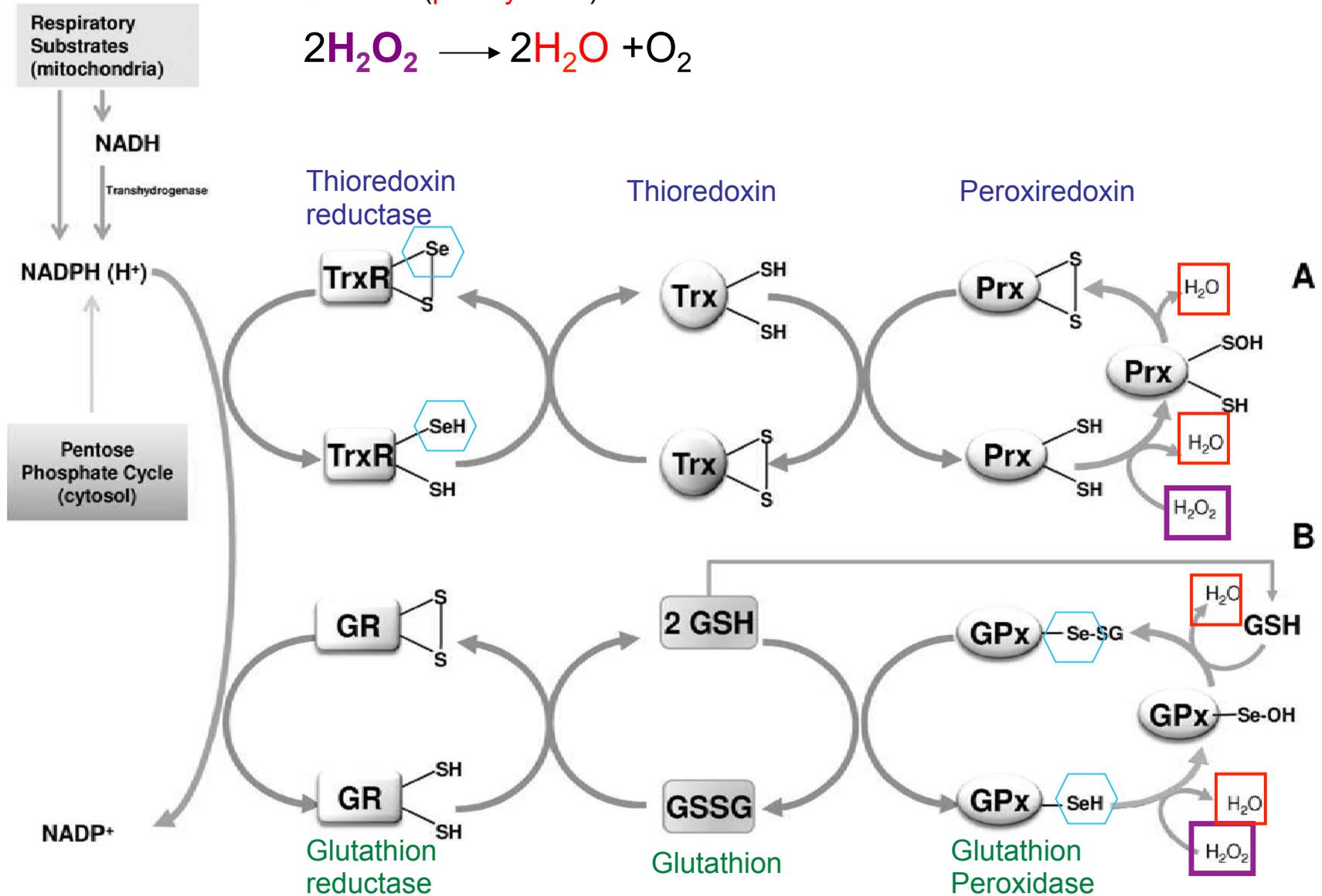
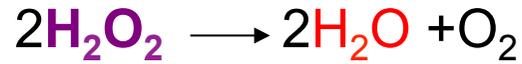


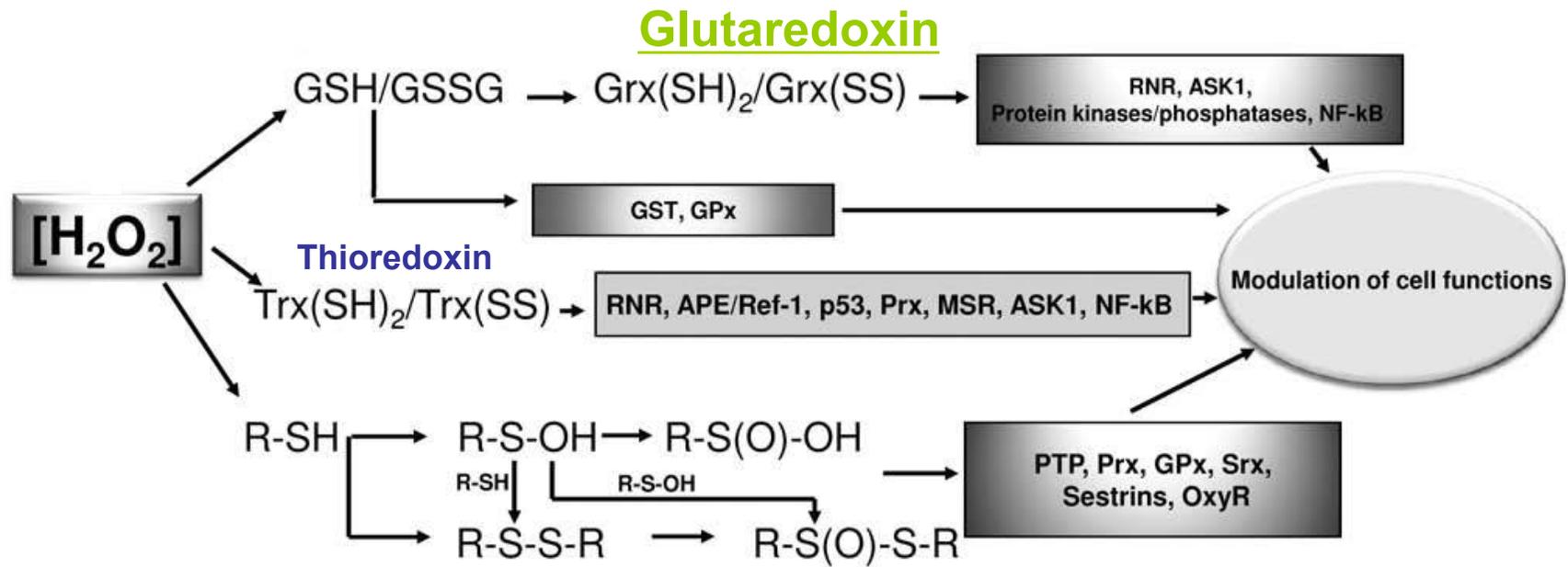
Regulation and modifications of human thioredoxin 1

The primary structure in **(A)** is colored according to the secondary structure elements shown in **(B)**

LA REDUCTION de H₂O₂ en H₂O

Catalase (peroxysome)





Glutaredoxines ou glutathionredoxines(Grx)

Très comparables aux Thioredoxines. Petites enzymes redox;
Elles facilitent la réduction des autres protéines, par l'échange, disulfure-thiol: $S-S \rightarrow SH$;
elles ont quantité de cibles (dont certaines peroxiredoxines)

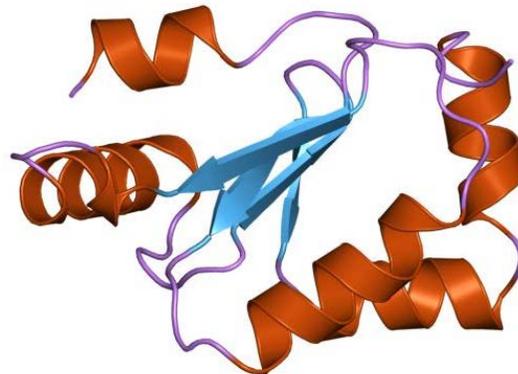
Existent dans tous les organismes vivants

Elles ont une structure 3D, voisine des thiorédoxines

Leur site actif comporte toujours un thiol-disulfure

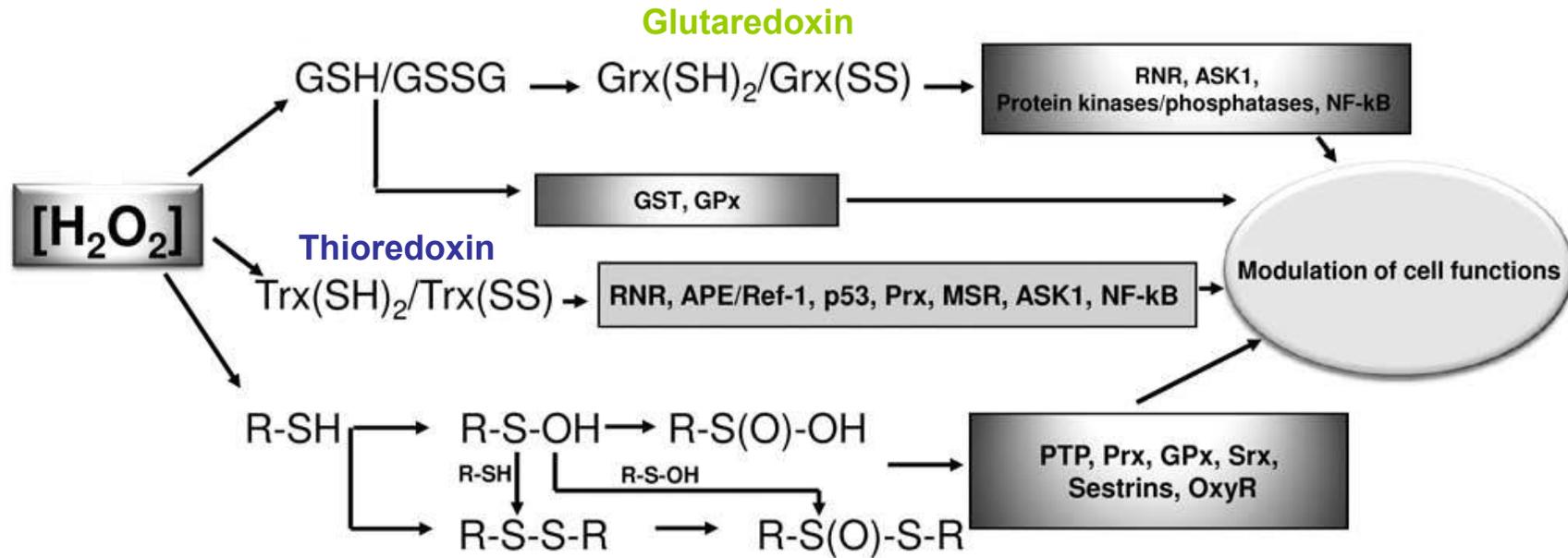
Elles comportent aussi un ou plusieurs motifs CXXC

Elles sont maintenues réduites non pas par une réductase mais sont réduites par l'oxydation du glutathion .

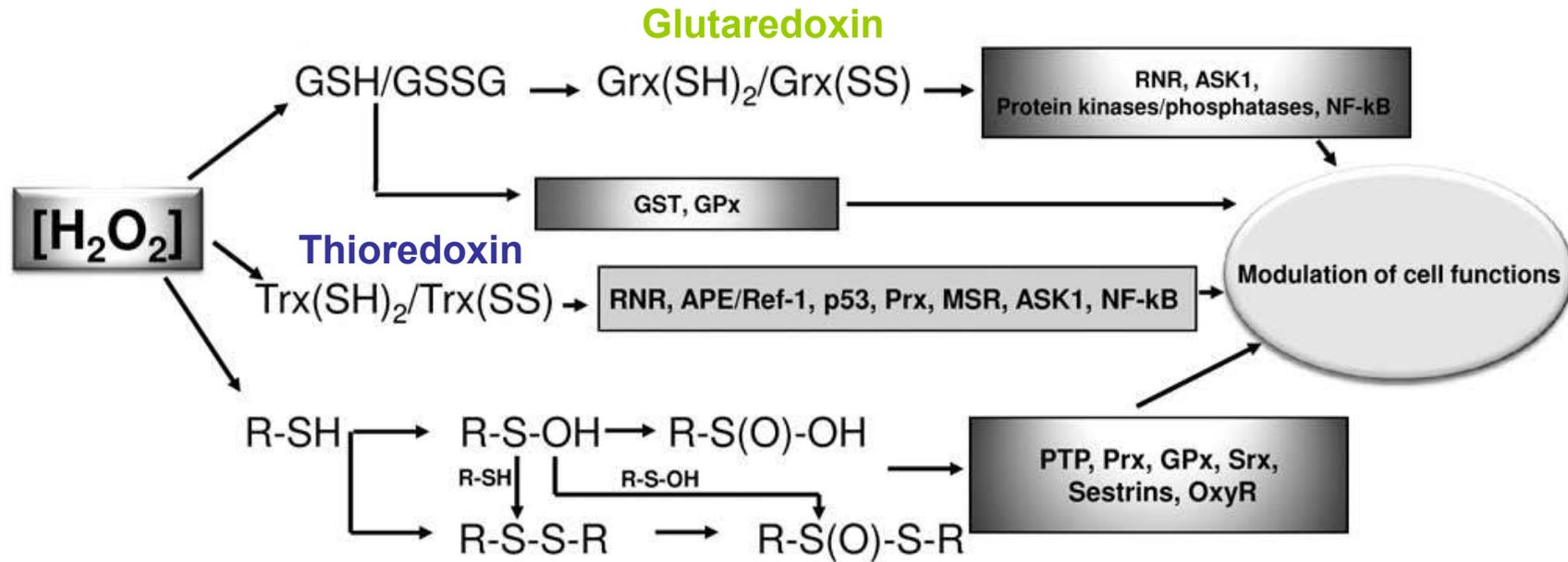


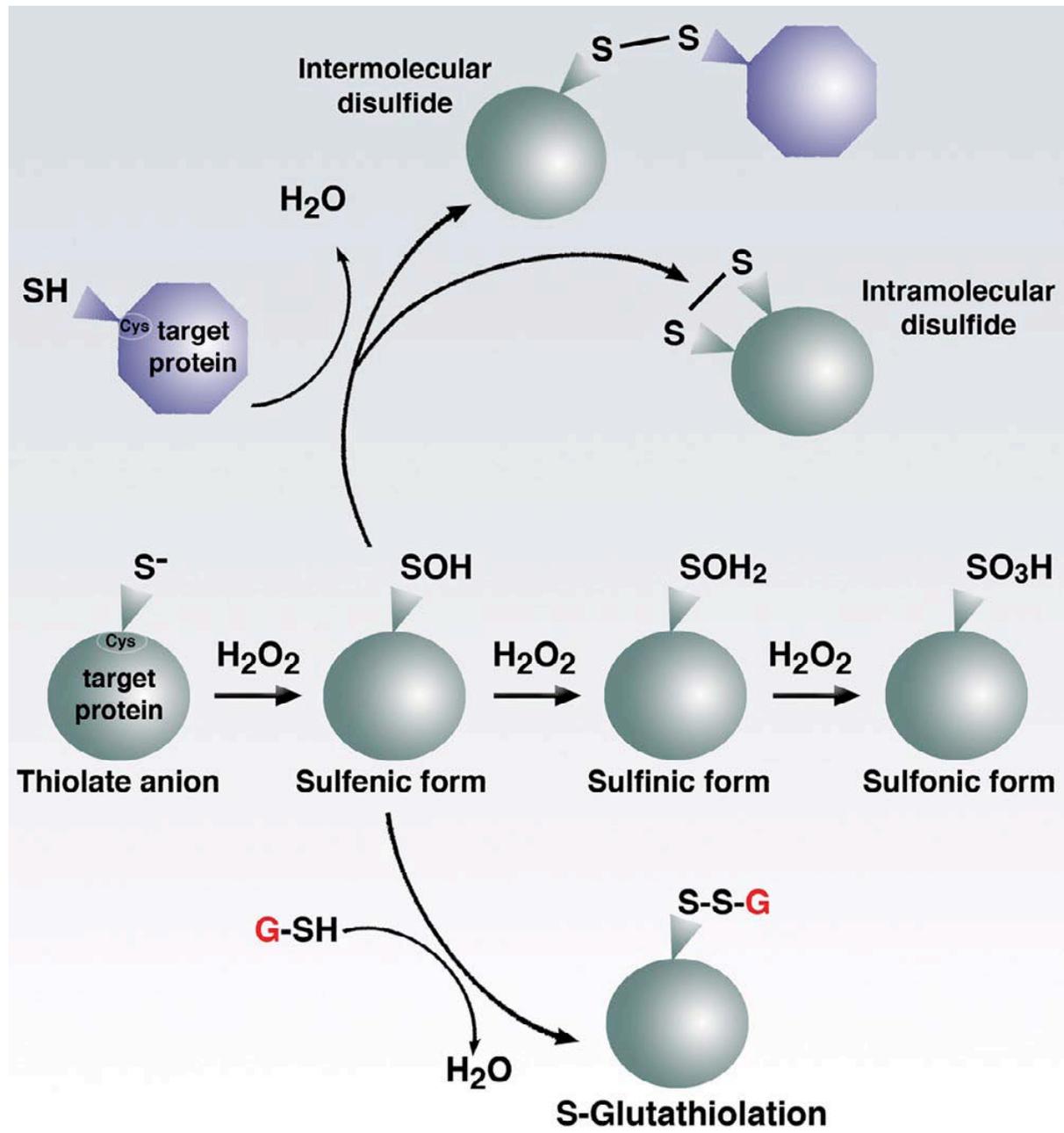
glutaredoxine

SIGNALISATION H₂O₂



SIGNALISATION *via* H₂O₂





PLAN du COURS

Aspects cellulaires

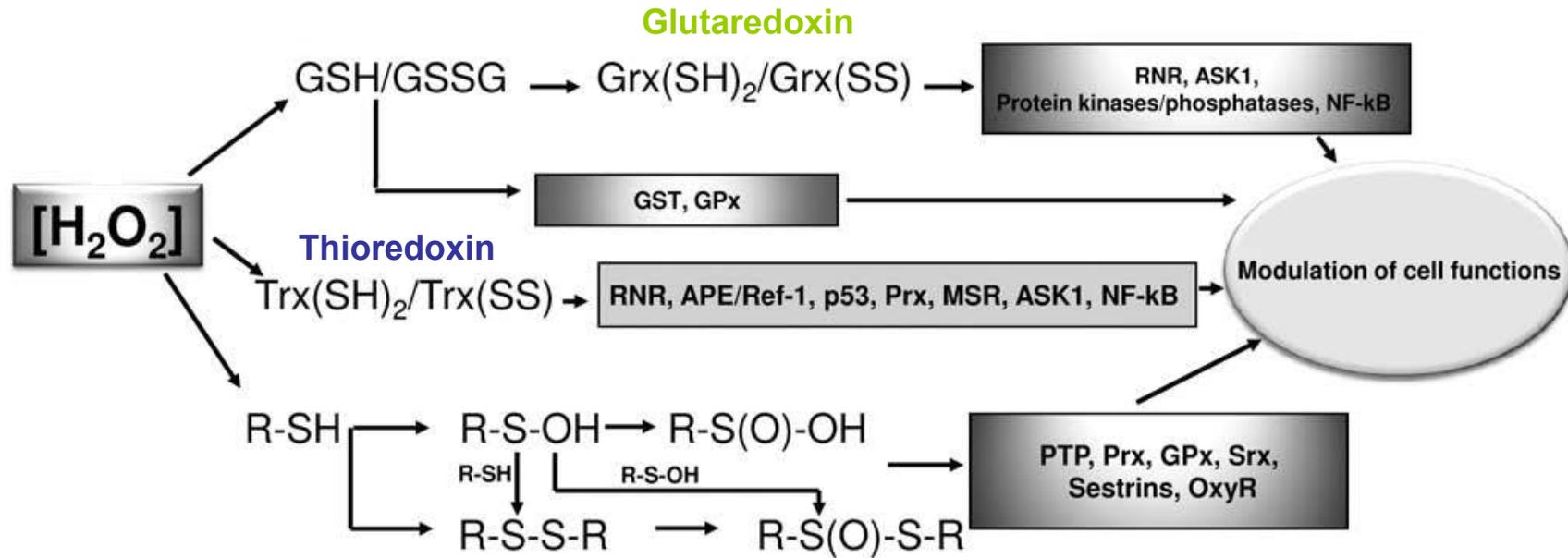
- impacts
 - 1) A- la signalisation *via* des récepteurs, B- la transcription (facteurs de transcription et épigénèse) C- élimination des protéines mal repliées (*misfolding*)
 - 2) méthodes de détection des agents de la signalisation. D- la signalisation à distance: le dialogue mitochondrie-RER et la motilité des organelles (mitochondrie) comme modulateur de la signalisation redox.

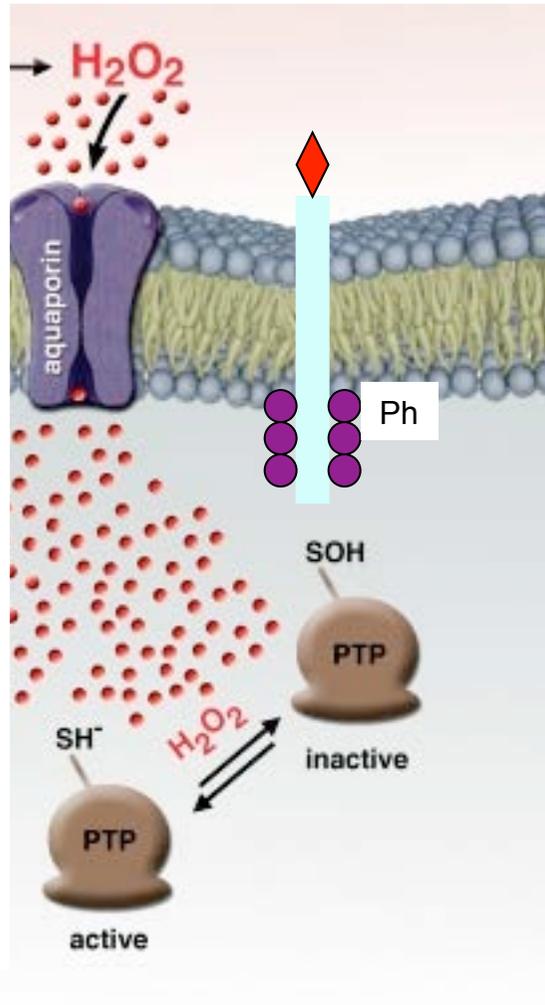
- homéostasie redox et atteintes héréditaires de l'audition

Formes monogéniques de surdité: GRXCR1 (domaine de type GRX-like: *DFNB25*, *Pirouette*)
Miner-1 (protéine 2Fe2S le syndrome de Wolfram)

Presbyacousie: GST1 et GST2 (glutathion transférases) les modèles animaux de presbyacousie

SIGNALISATION H_2O_2





Adapted from Finkel T, JCB, 2011

Les facteurs de transcription dont l'activité est modulée par le statut REDOX

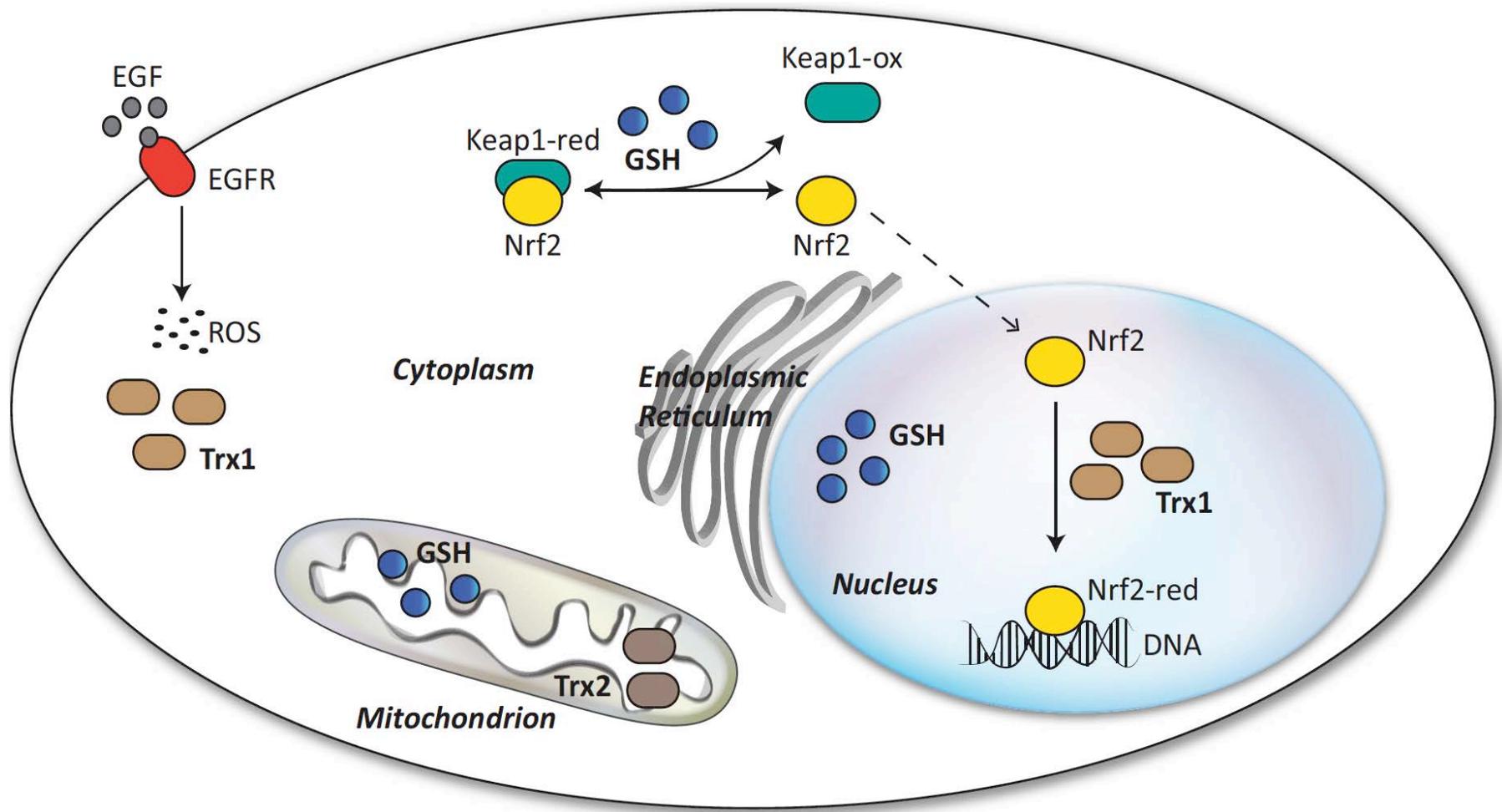
Les facteurs de **transcription à doigt de zinc** (liaison à l'ADN) sont particulièrement sensibles au stress oxydant:

Sp1 (Cyst2/His2), récepteurs aux glucocorticoïdes, Egr1 (Early growth response protein) (3Zn-fingers), P53 (*DEM inhibe sa fixation à l'ADN, or P53 augmente l'expression de « gènes anti-oxydants*). La réponse au stress oxydatif induite par p53 a un acteur majeur, TP53INP1. Ce composé a des **fonctions antioxydantes**

Le facteur apparenté au facteur NF-E2, **Nrf2**, est un facteur de transcription sensible au statut d'oxydoréduction. En réponse à un stress oxydant, Nrf2 contrôle le devenir des cellules en augmentant la transcription de gènes qui portent dans leur promoteur un élément dit de réponse antioxydante, abrégé en **ARE** (*antioxidant response element*). Cet élément se trouve dans le promoteur de beaucoup de gènes **qui codent pour des antioxydants endogènes (GST, GPX, PRX-1, TrxR)**. Nrf2 dans le cytoplasme est associé à la protéine, Keap1. En réponse à un signal oxydant, Keap est oxydé. Il y a rupture de son association avec Nrf2. Nrf2 se transloque alors au noyau il est activé par sa réduction due à la **thiorédoxine**.

Le facteur de transcription **NF-kB** est aussi sensible au stress oxydant et contrôle l'expression de protéines anti-oxydantes, **MnSOD et les enzymes de la synthèse du glutathion**.

Les facteurs **AP-1 et c-Jun N-terminal kinase (JNK)** sont aussi sensibles au stress oxydant, et provoquent une réponse adaptative. Leur activation dépend de la « **Thioredoxin reductase** » qui réduit la thiorédoxine qui gagne le noyau, active la voie redox, Ref-1 qui à son tour active AP-1 et c-Jun N-terminal kinase (JNK).



Les facteurs de transcription dont l'activité est modulée par le statut REDOX

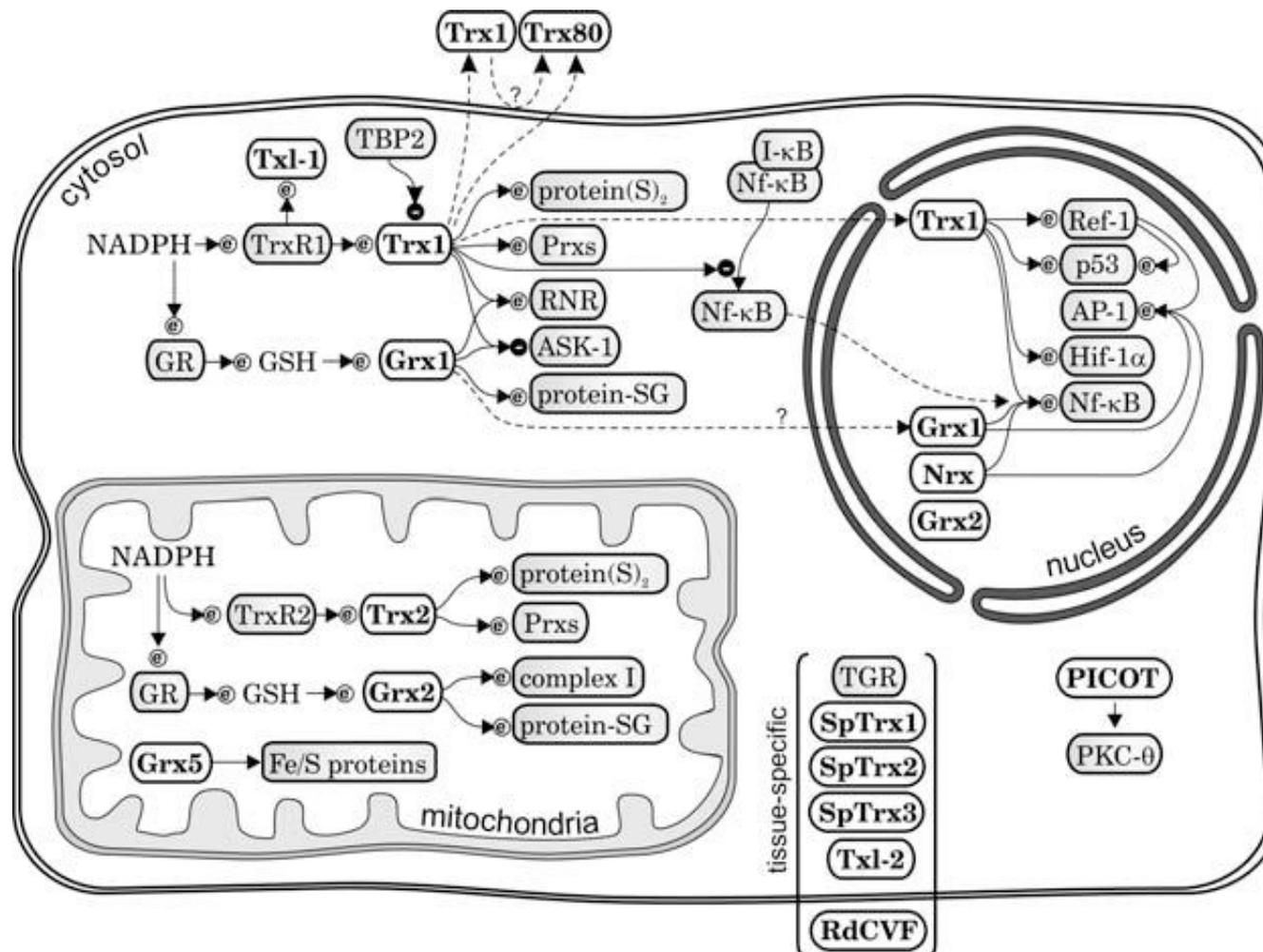
Les facteurs de **transcription à doigt de zinc** (liaison à l'ADN) sont particulièrement sensibles au stress oxydant:

Sp1 (Cyst2/His2), récepteurs aux glucocorticoïdes, Egr1 (Early growth response protein) (3Zn-fingers), P53 (*DEM inhibe sa fixation à l'ADN, or P53 augmente l'expression de « gènes anti-oxydants*). La réponse au stress oxydatif induite par p53 a un acteur majeur, TP53INP1. Ce composé a des **fonctions antioxydantes**

Le facteur apparenté au facteur NF-E2, **Nrf2**, est un facteur de transcription sensible au statut d'oxydoréduction. En réponse à un stress oxydant, Nrf2 contrôle le devenir des cellules en augmentant la transcription de gènes qui portent dans leur promoteur un élément dit de réponse antioxydante, abrégé en **ARE** (*antioxidant response element*). Cet élément se trouve dans le promoteur de beaucoup de gènes **qui codent pour des antioxydants endogènes (GST, GPX, PRX-1, TrxR)**. Nrf2 dans le cytoplasme est associé à la protéine, Keap1. En réponse à un signal oxydant, Keap est oxydé. Il y a rupture de son association avec Nrf2. Nrf2 se transloque alors au noyau il est activé par sa réduction due à la **thiorédoxin**.

Le facteur de transcription **NF-kB** est aussi sensible au stress oxydant et contrôle l'expression de protéines anti-oxydantes, **MnSOD et les enzymes de la synthèse du glutathion**.

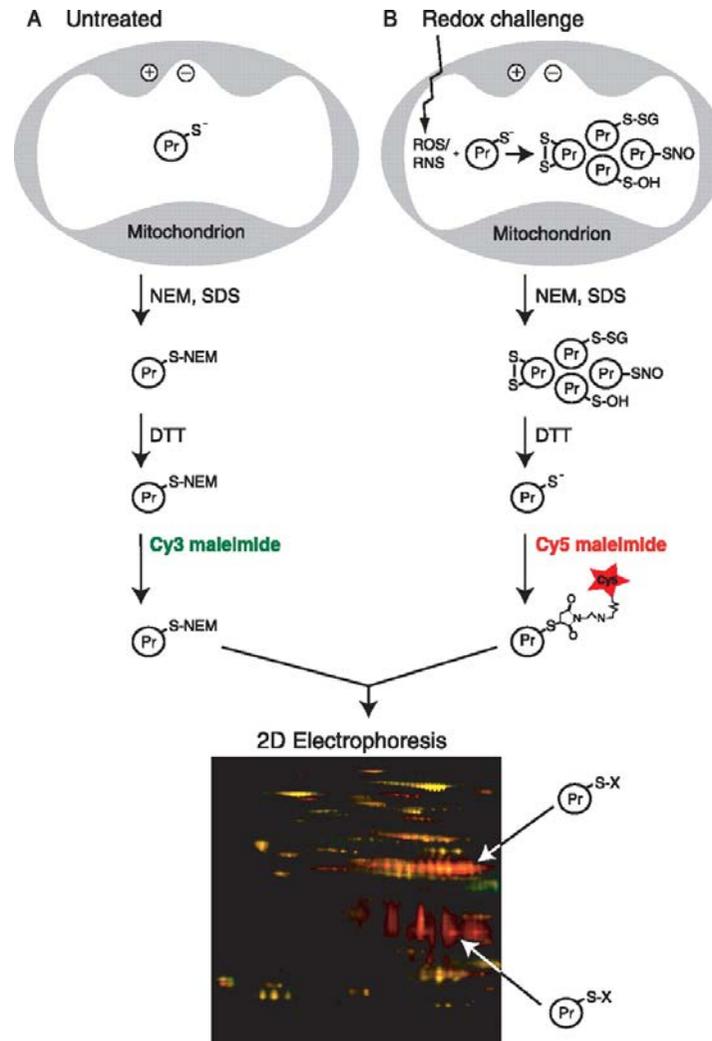
Les facteurs **AP-1 et c-Jun N-terminal kinase (JNK)** sont aussi sensibles au stress oxydant, et provoquent une réponse adaptative. Leur activation dépend de la « **Thioredoxin reductase** » qui réduit la thiorédoxine qui gagne le noyau, active la voie redox, Ref-1 qui, à son tour, active AP-1 et c-Jun N-terminal kinase (JNK).



Overview of the thioredoxin and glutaredoxin systems and some of their targets in and outside the cell.

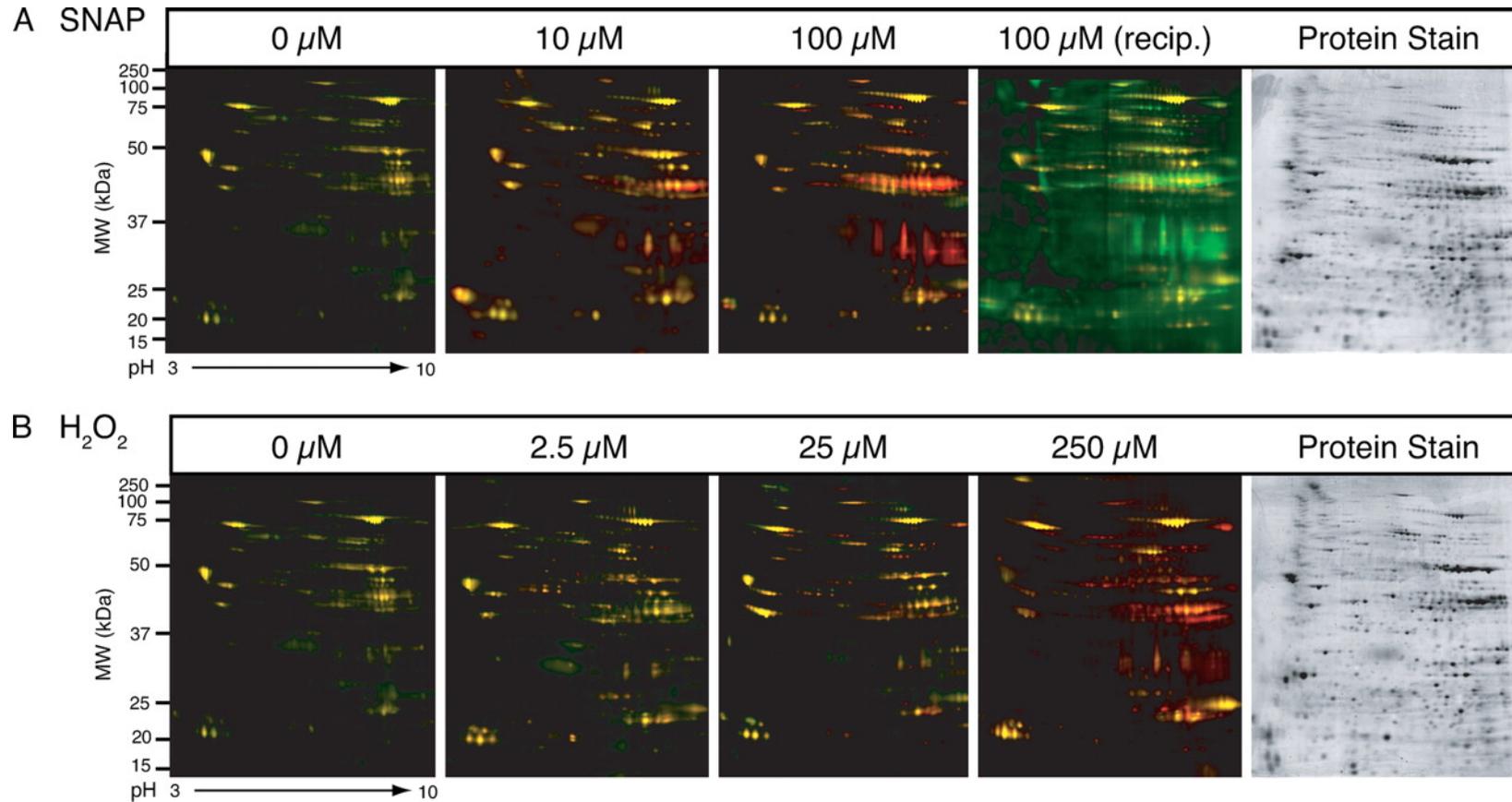
From CHRISTOPHER HORST LILLIG and ARNE HOLMGREN
 ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING
 Volume 9, Number 1, 2007

The redox-DIGE (*difference gel electrophoresis*) technique. A, in control mitochondria, free protein thiols (PrS-) are blocked with NEM, treated with DTT, and labeled with Cy3 maleimide (green).

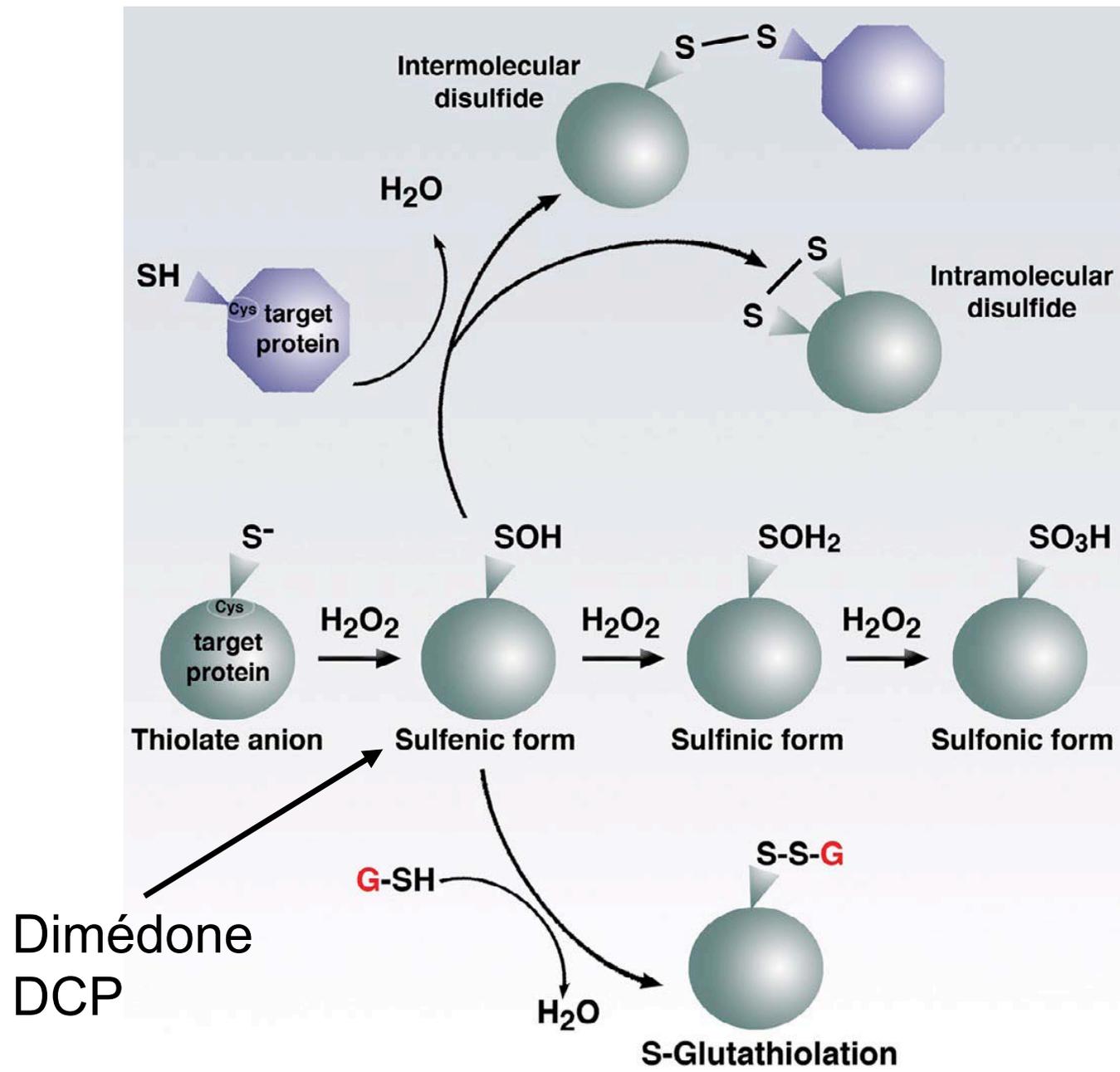


Hurd T R et al. J. Biol. Chem. 2007;282:22040-22051

Effect of oxidants on mitochondrial protein thiols determined by redox-DIGE.



Hurd T R et al. J. Biol. Chem. 2007;282:22040-22051



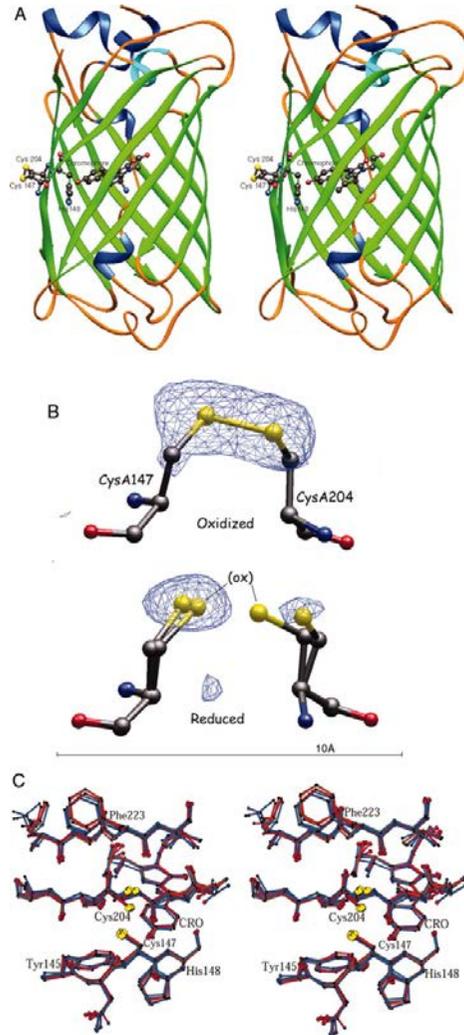
Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-sensitive Green Fluorescent Protein Indicators*

Received for publication, November 24, 2003, and in revised form, January 1, 2004
Published, JBC Papers in Press, January 13, 2004, DOI 10.1074/jbc.M312846200

George T. Hanson‡ ‡‡, **Robert Aggeler**§, **Devin Oglesbee**§, **Mark Cannon**‡, **Roderick A. Capaldi**§,
Roger Y. Tsien¶, and **S. James Remington**||**

From the §Departments of Biology, ‡Chemistry and ||Physics, Institute of Molecular Biology, University of Oregon, Eugene, Oregon 97403-1229, and the ¶Department of Chemistry and Biochemistry and Department of Pharmacology, University of California San Diego, La Jolla, California 92093-0647

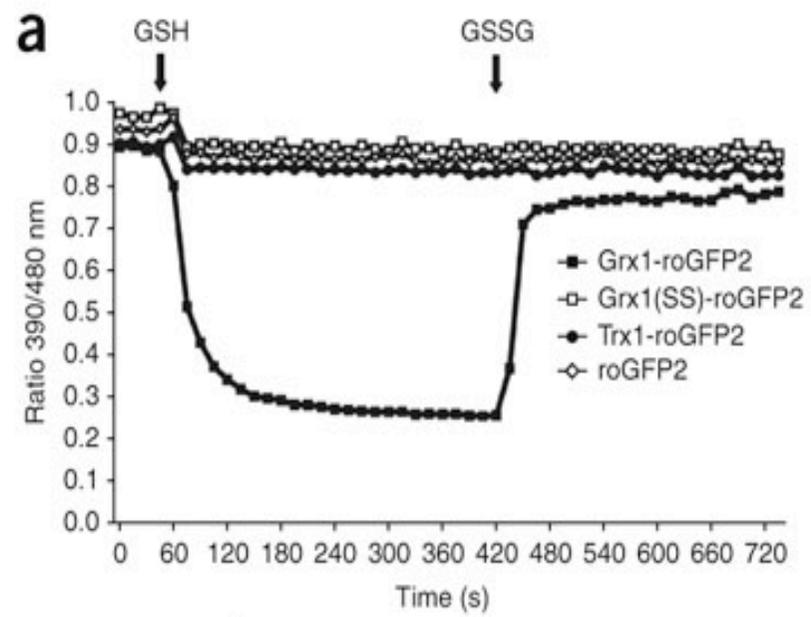
Key structural features of roGFP2, figures produced by RIBBONS (63) and MOLSCRIPT (1).



Hanson G T et al. J. Biol. Chem. 2004;279:13044-13053

Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential

Marcus Gutscher¹, Anne-Laure Pauleau¹, Laurent Marty², Thorsten Brach², Guido H Wabnitz³, Yvonne Samstag³, Andreas J Meyer² & Tobias P Dick¹



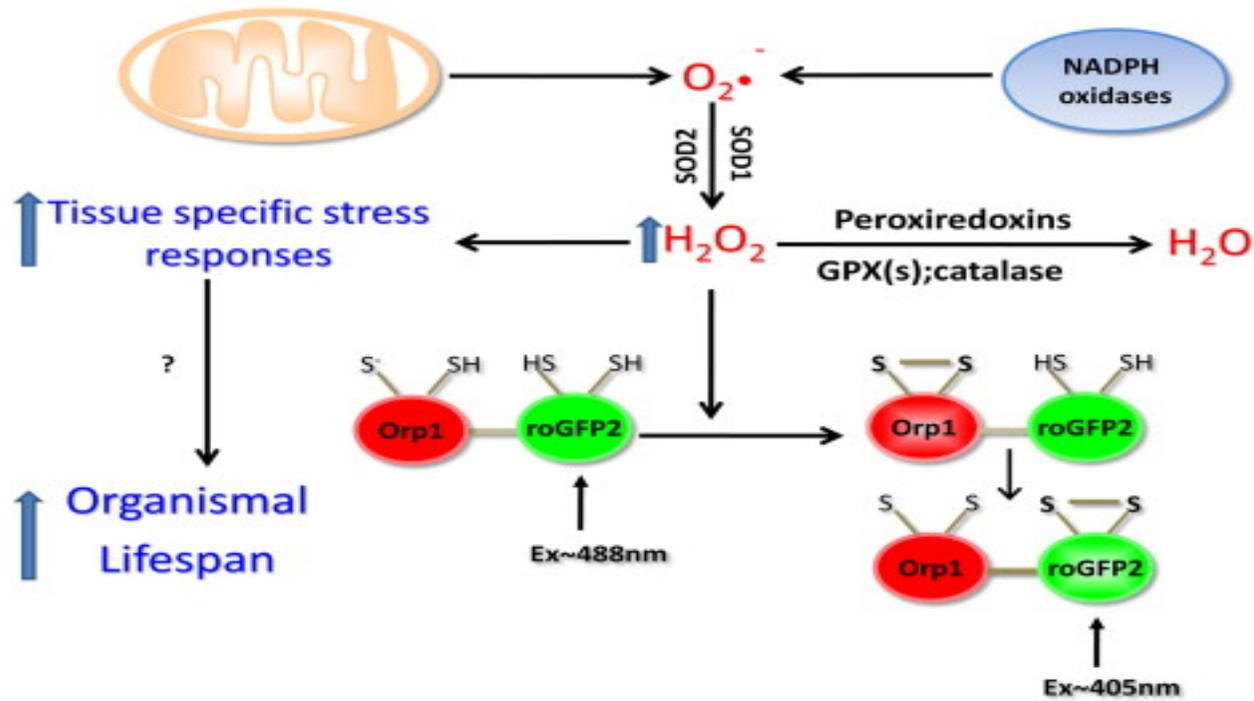


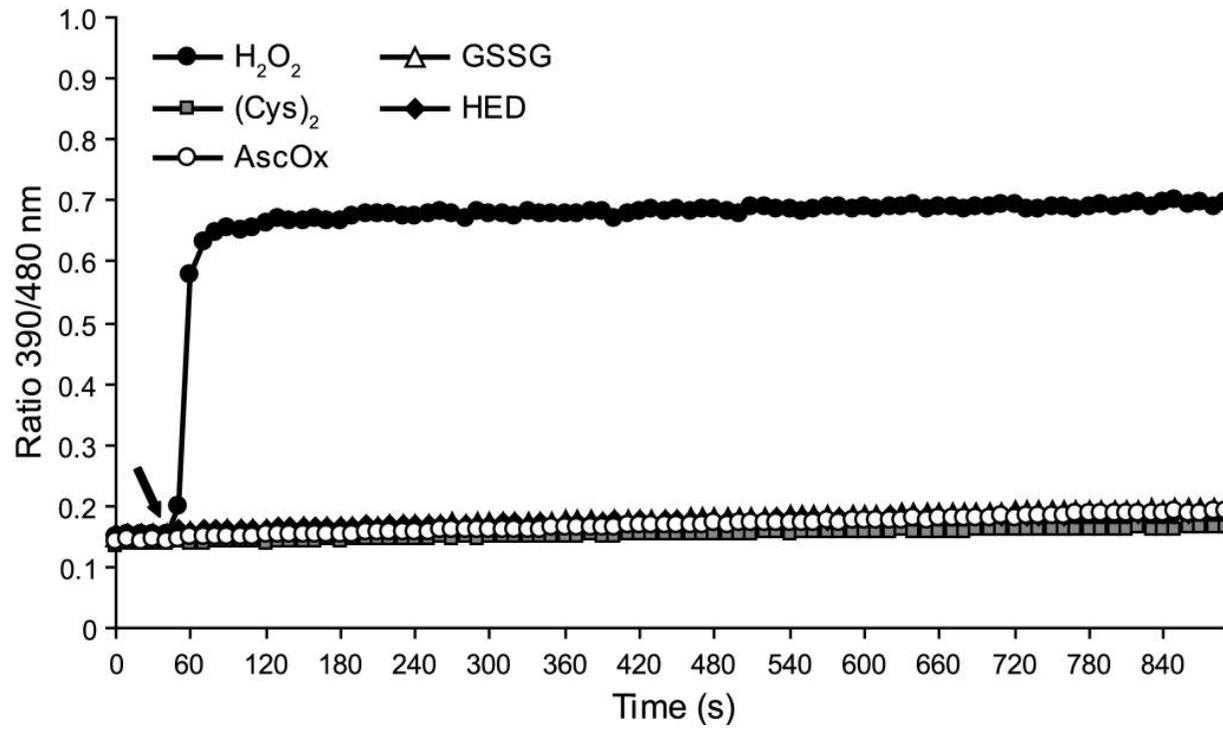
Figure 1 Redox-Sensitive GFPs Detect H_2O_2 Mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidases can generate superoxide, which is converted into H_2O_2 by SOD1 or SOD2. H_2O_2 is detoxified into H_2O by glutathione peroxidases (GPXs), catalas...

Kathryn V. Tormos , Navdeep S. Chandel

Seeing the Light: Probing ROS In Vivo Using Redox GFP

Cell Metabolism, Volume 14, Issue 6, 2011, 720 - 721

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.11.008>

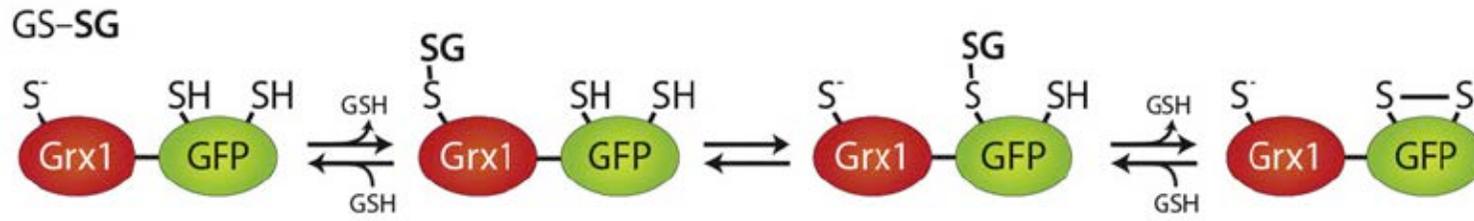


roGFP2-Orp1 specifically responds to H₂O₂.

From Gutscher M and Dick TP, *J. Biol. Chem*, 2009

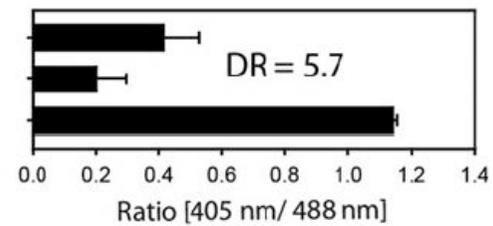
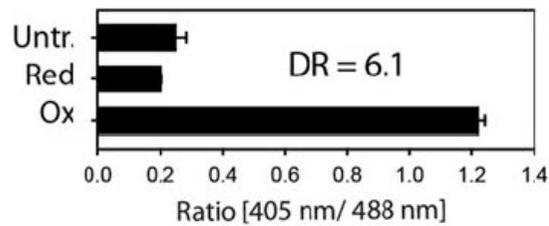
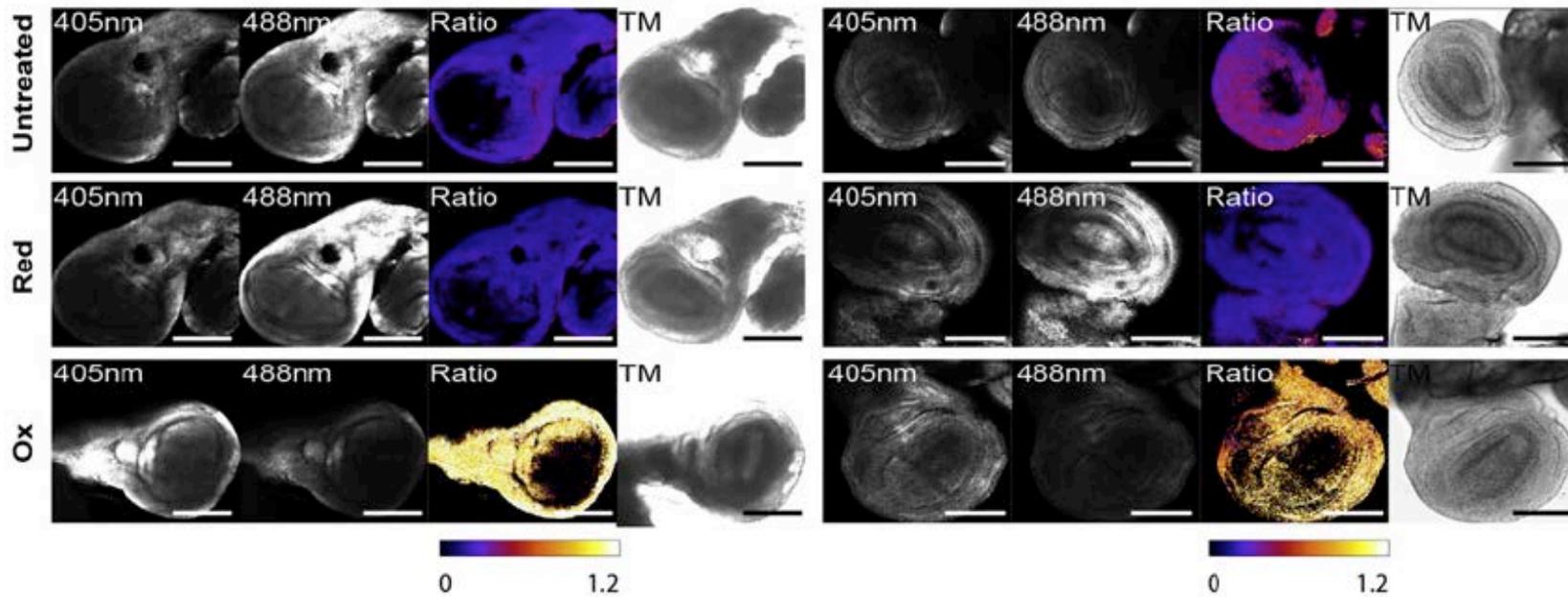
A

E_{GSH} biosensor expressing flies



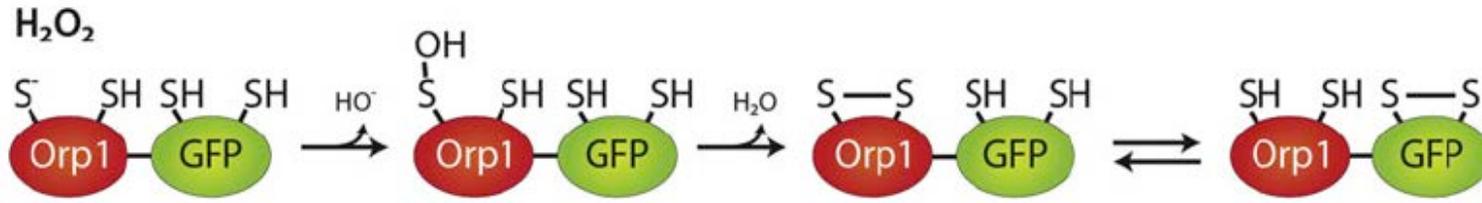
Cytosolic

Mitochondrial



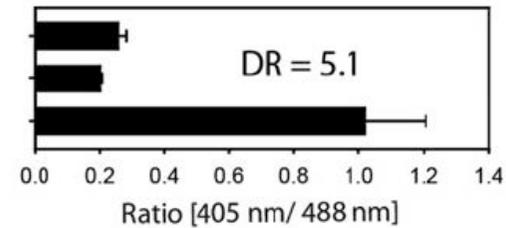
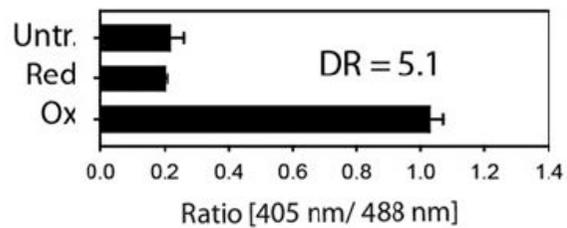
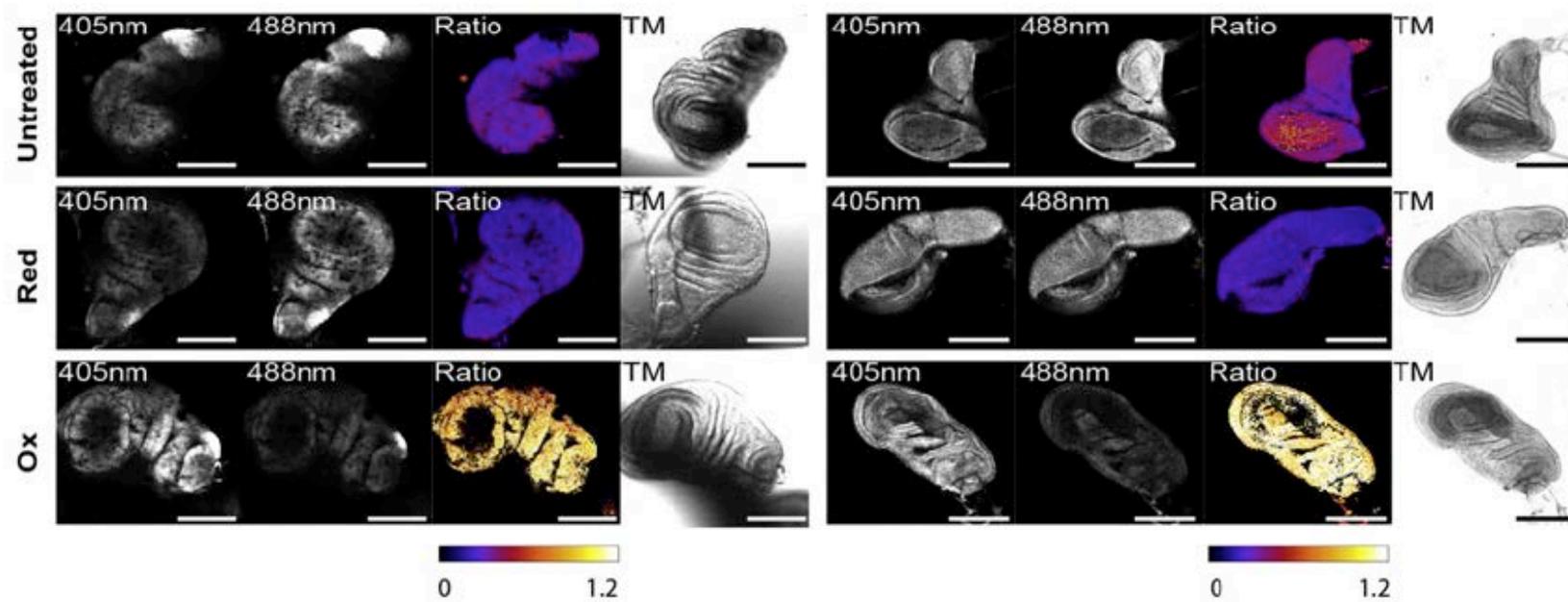
B

H₂O₂ biosensor expressing flies



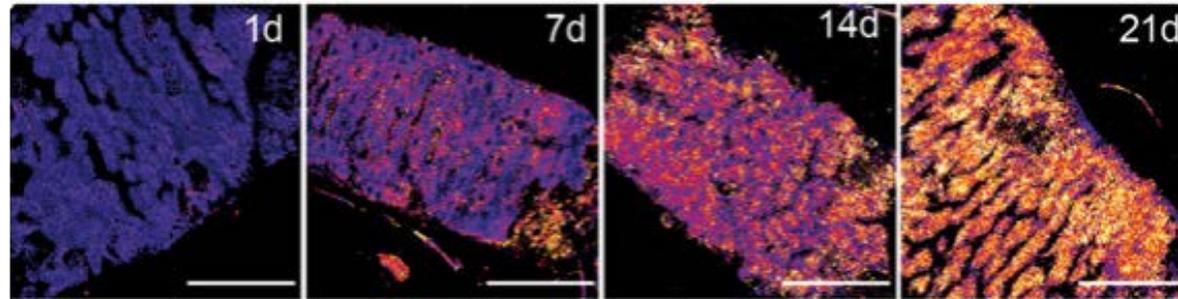
Cytosolic

Mitochondrial

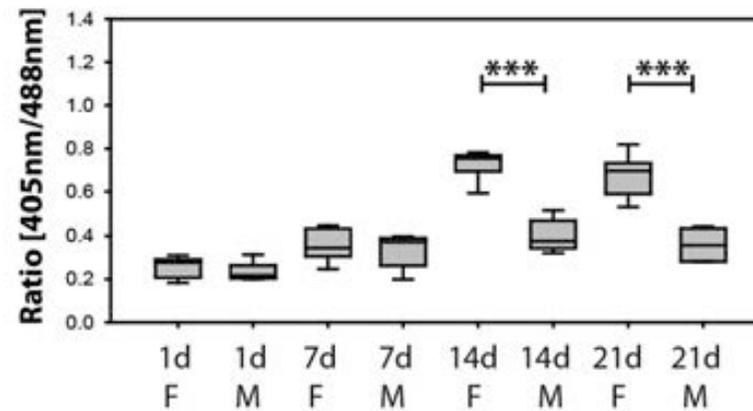
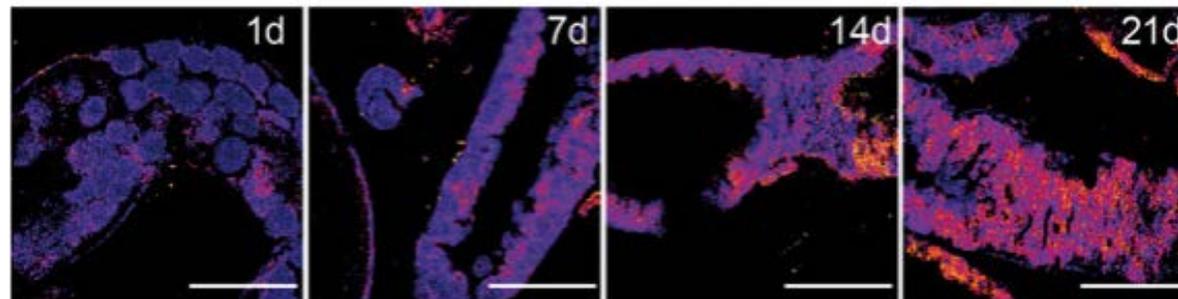


Age-related redox changes in the adult fly

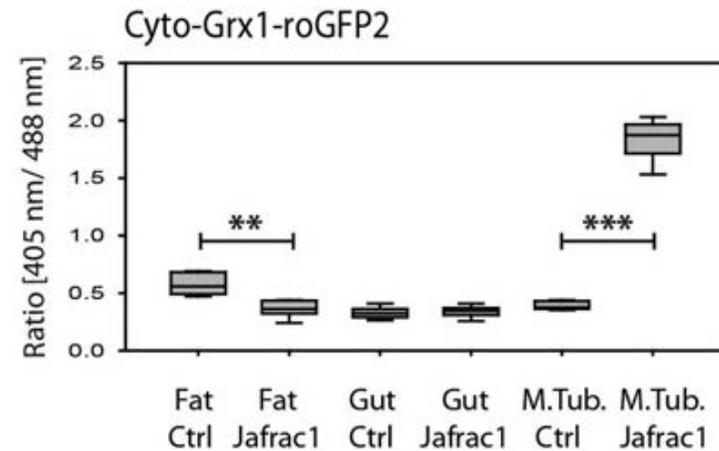
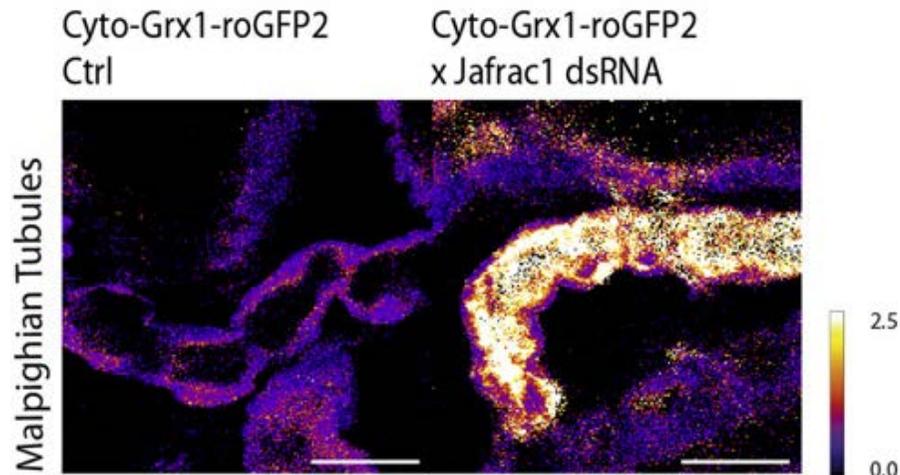
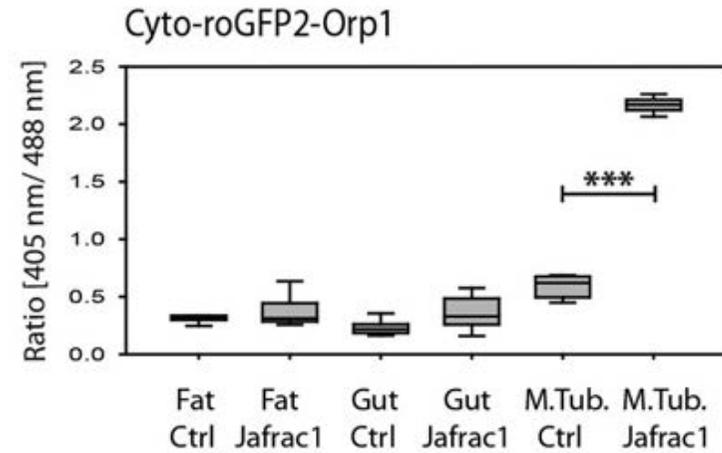
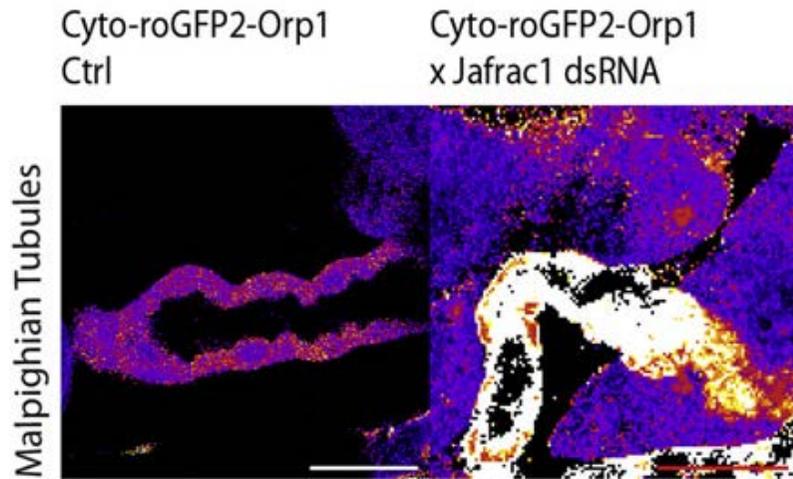
Cyto-roGFP2-Orp1 Females



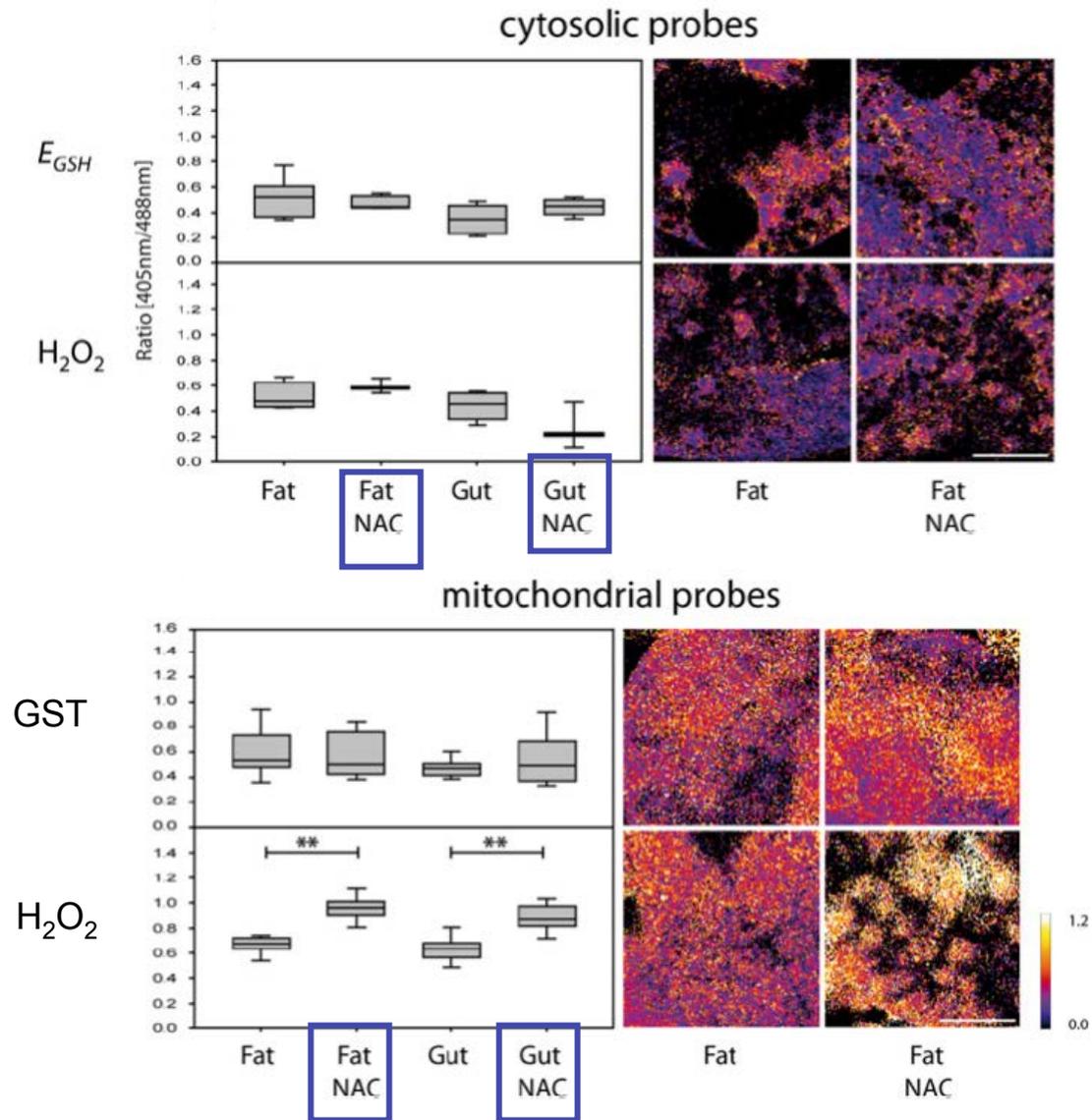
Cyto-roGFP2-Orp1 Males

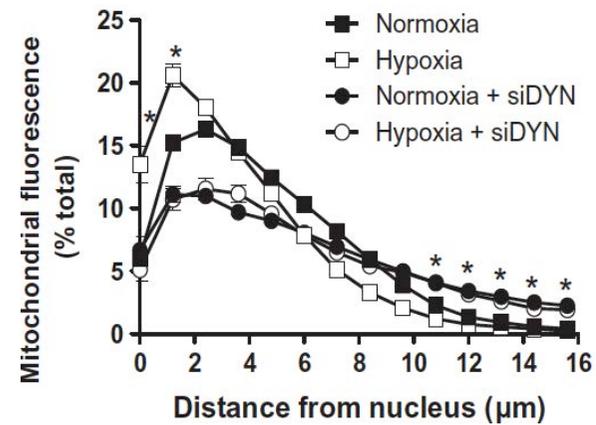
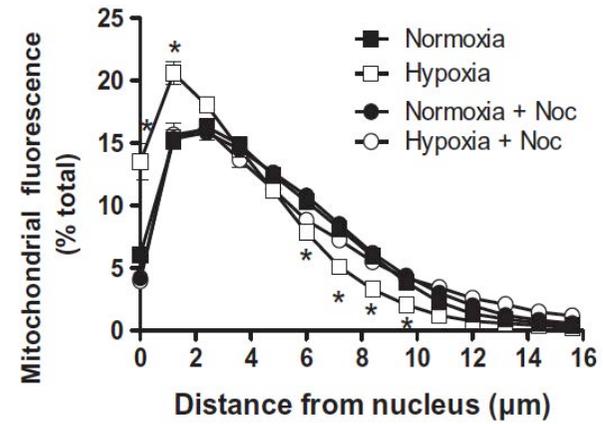
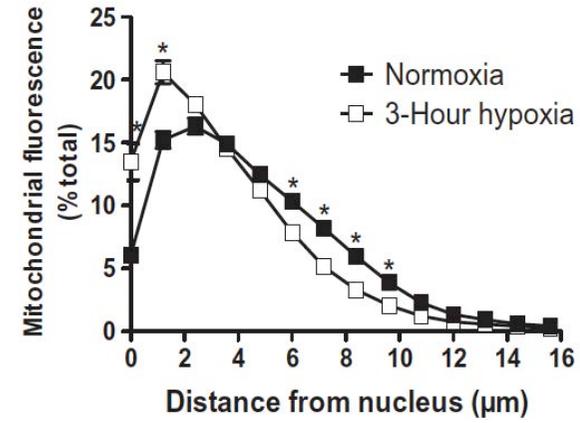
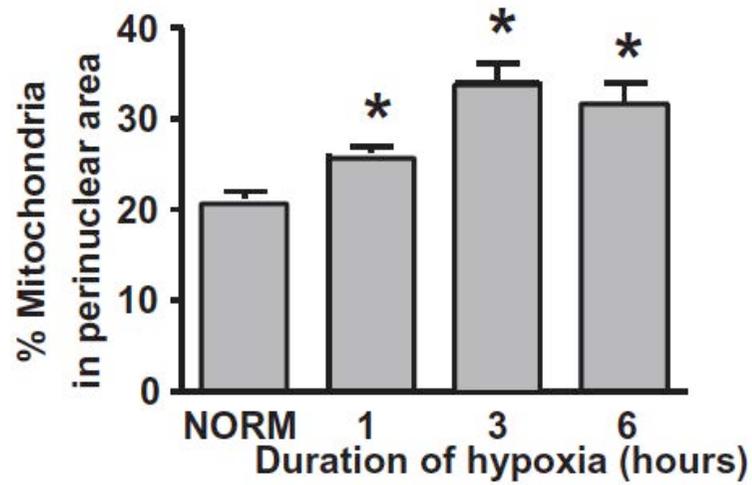
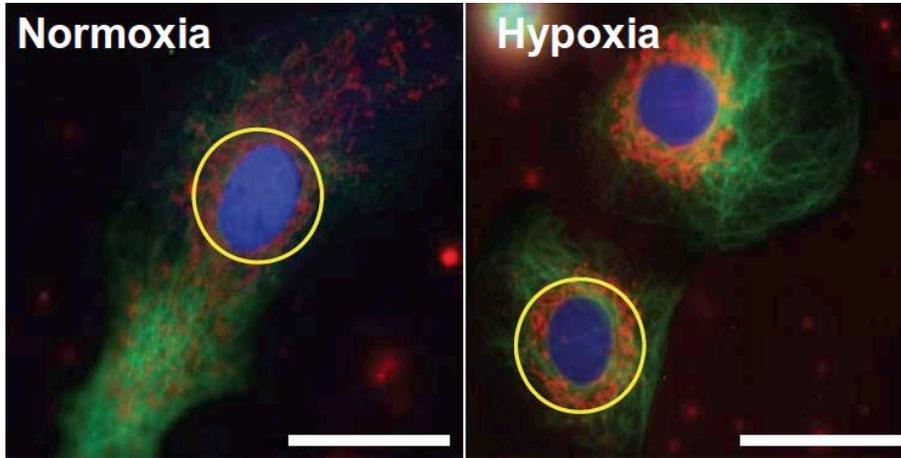


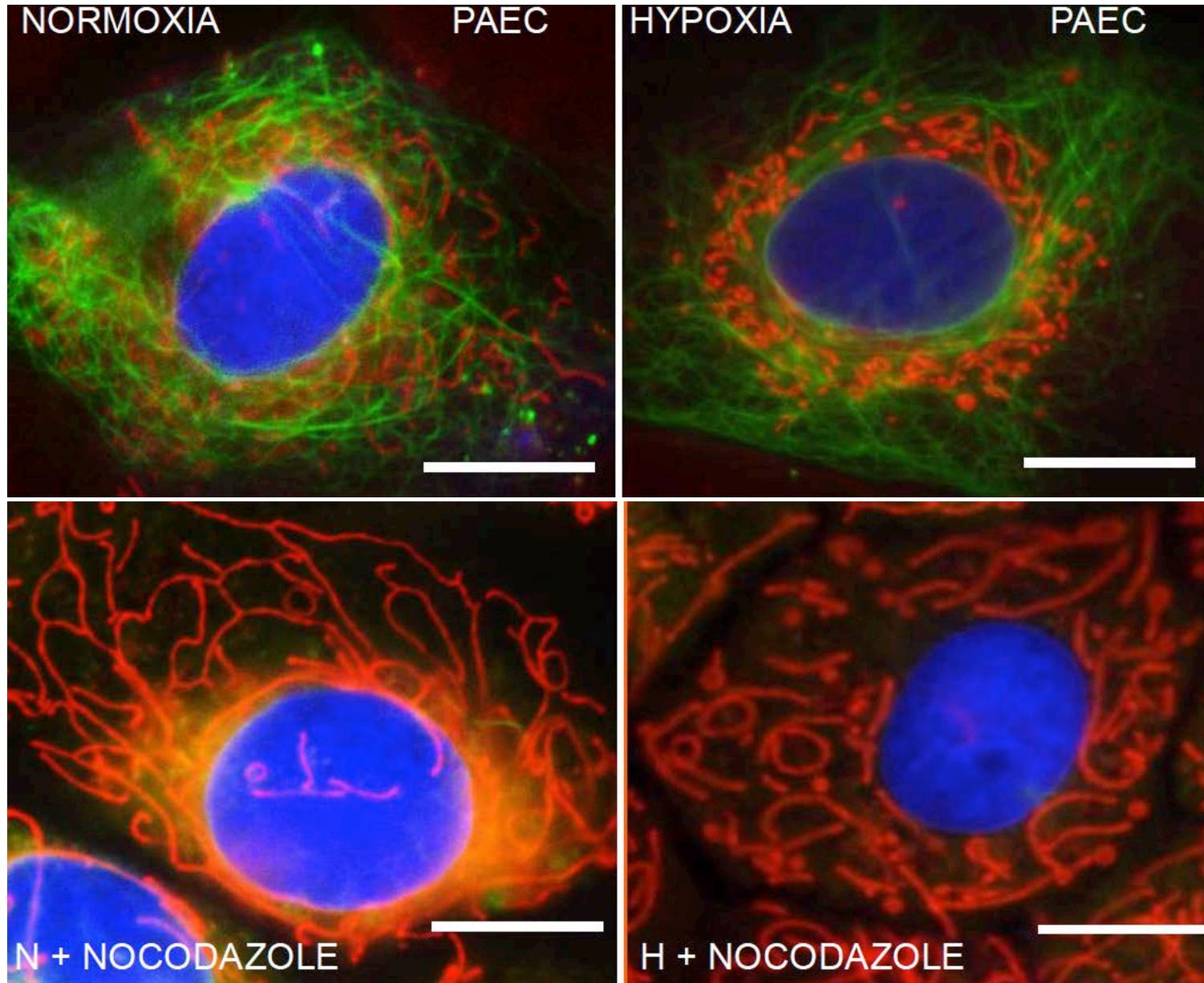
In vivo redox changes caused by gene silencing



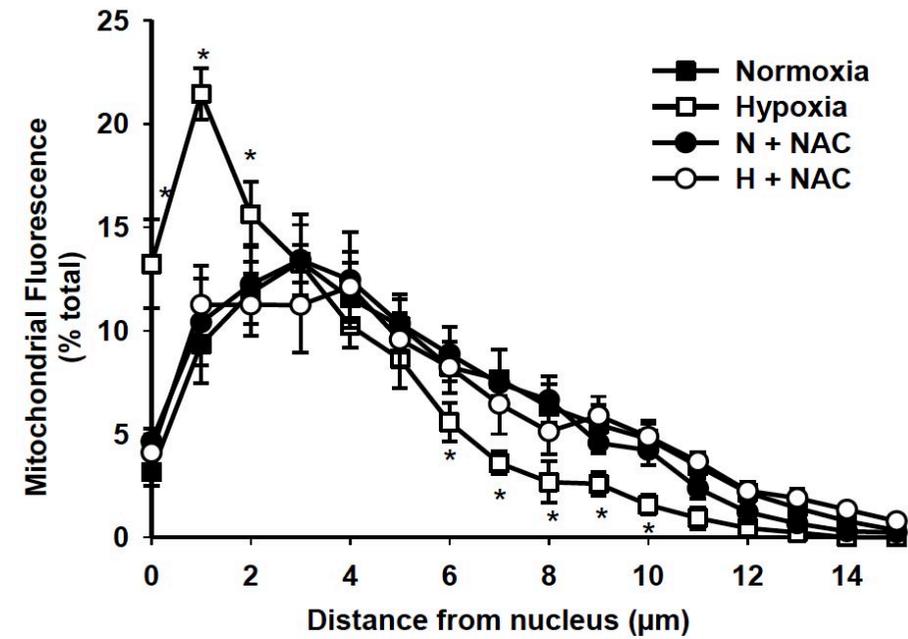
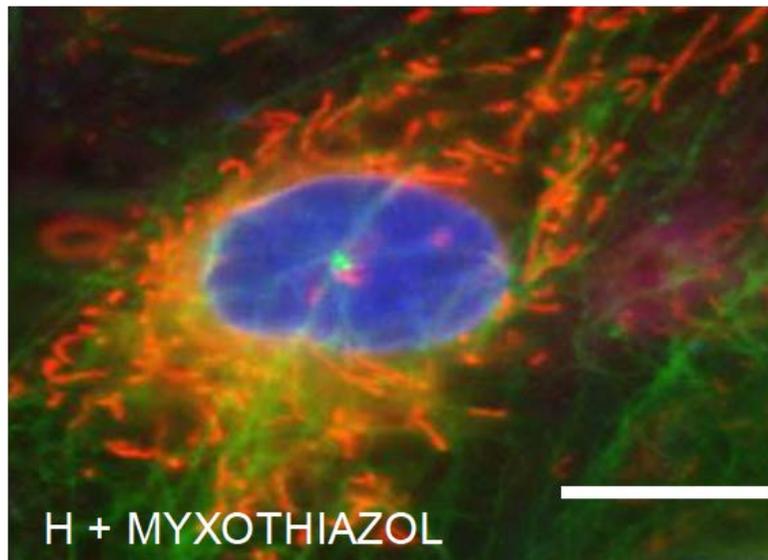
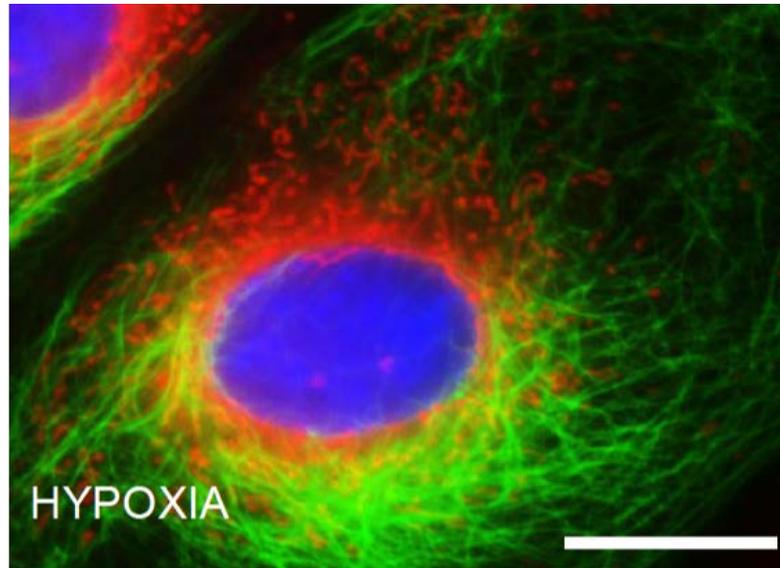
In vivo redox changes caused by pharmacological agents



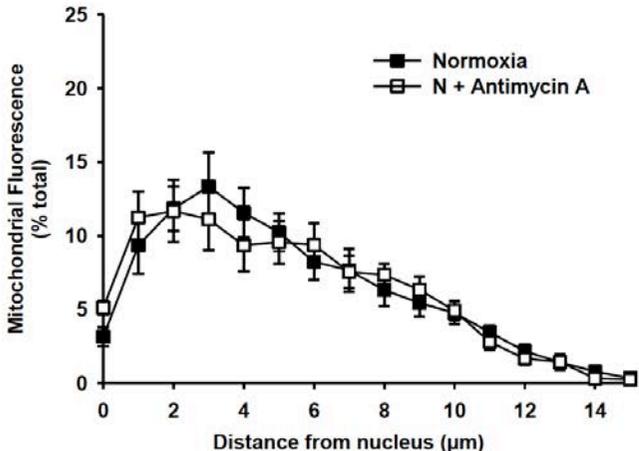
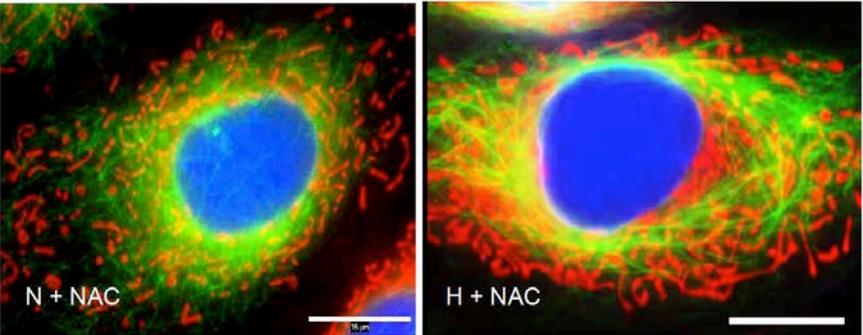
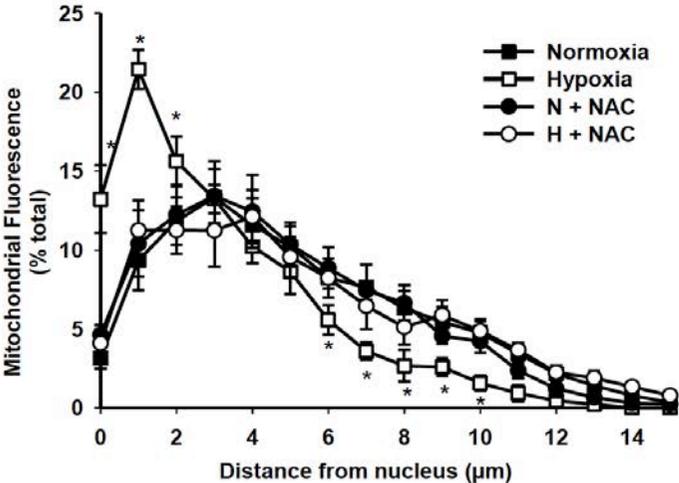




N=normoxia H=hopyxia

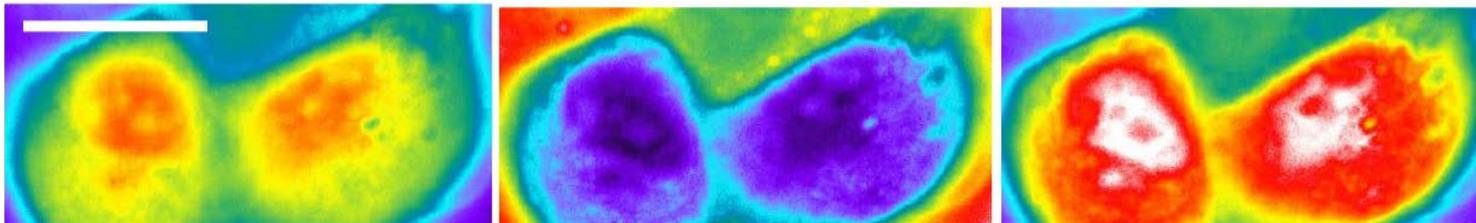
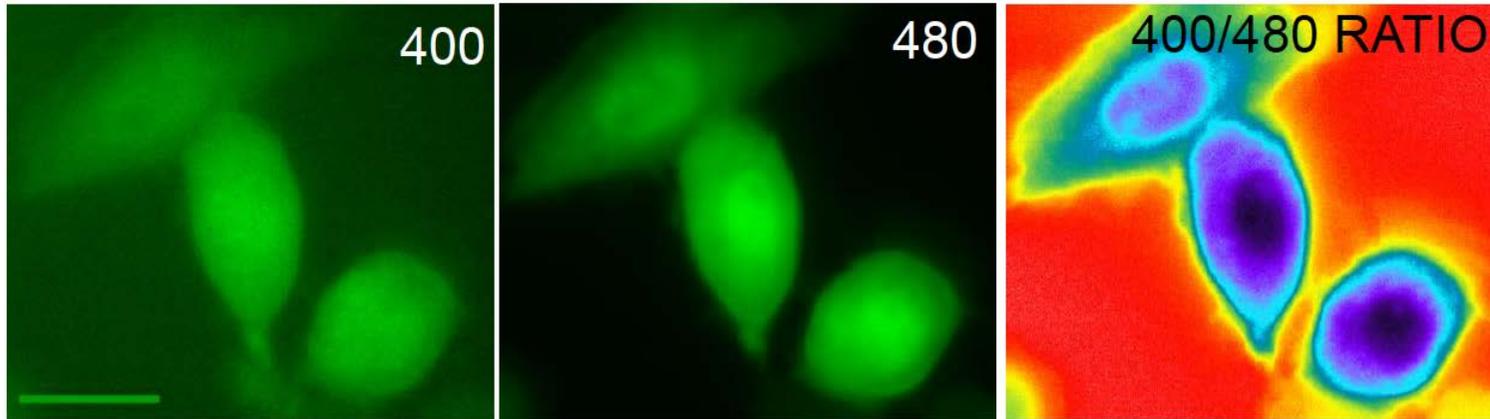


Involvement of ROS in hypoxia-induced perinuclear mitochondrial clustering



oxydée

réduite

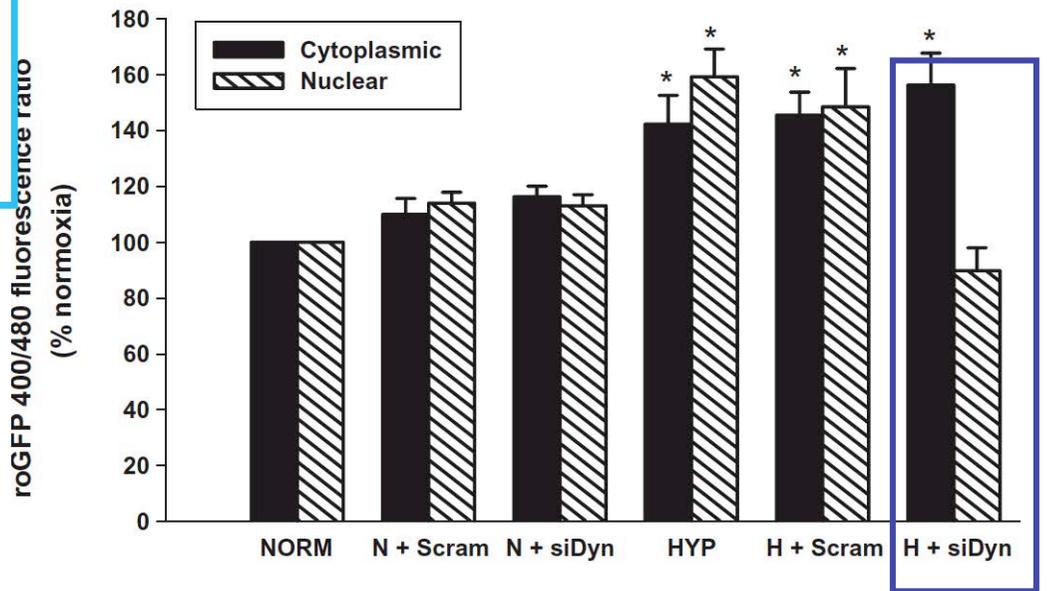
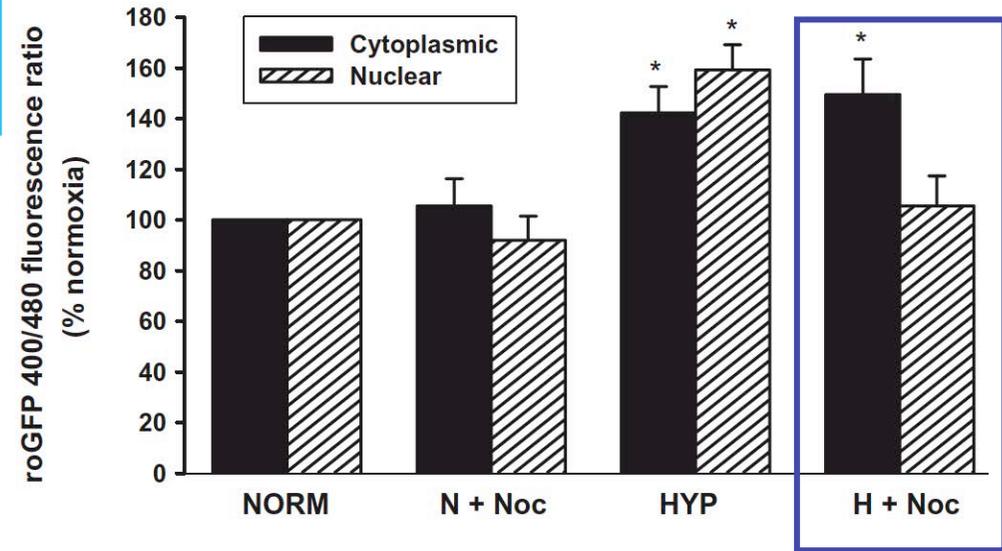
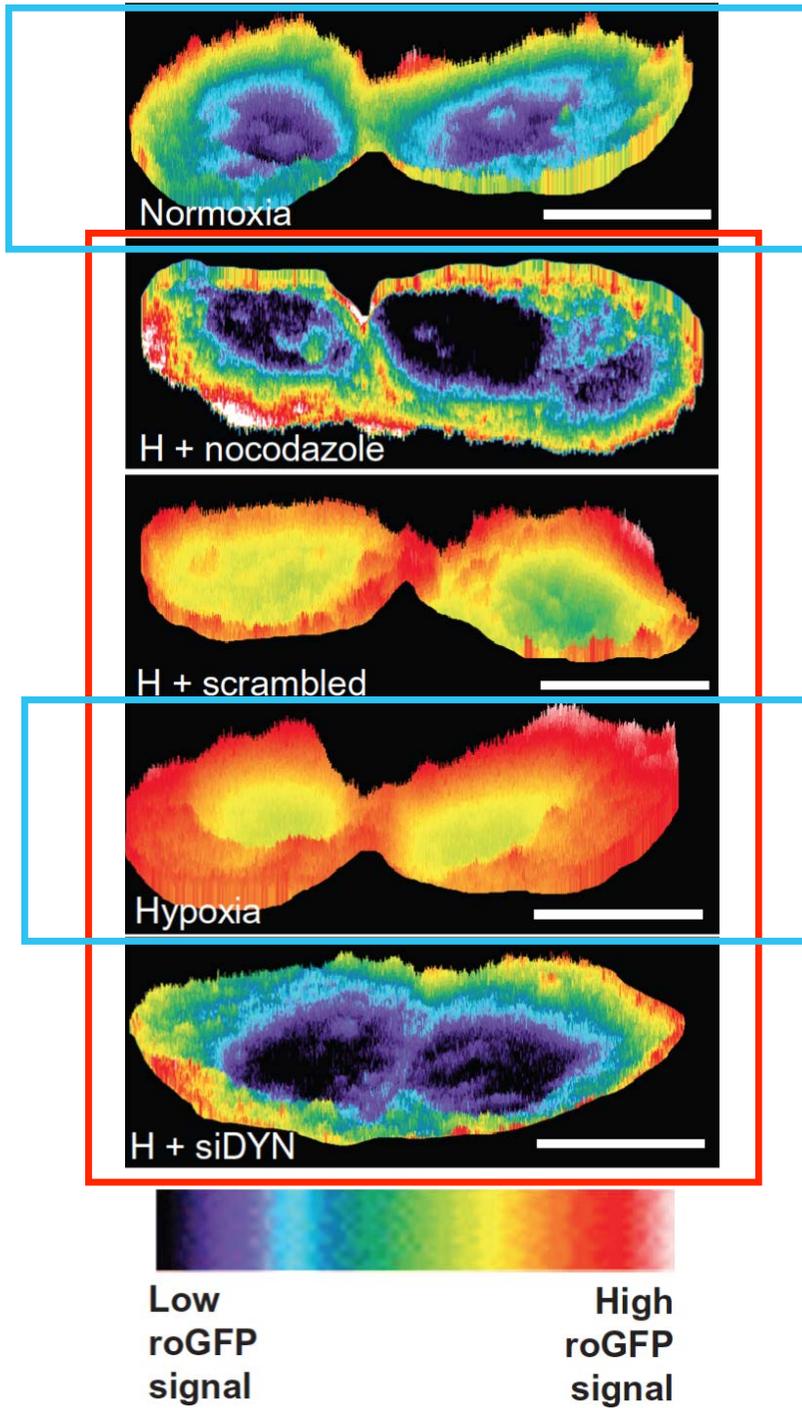


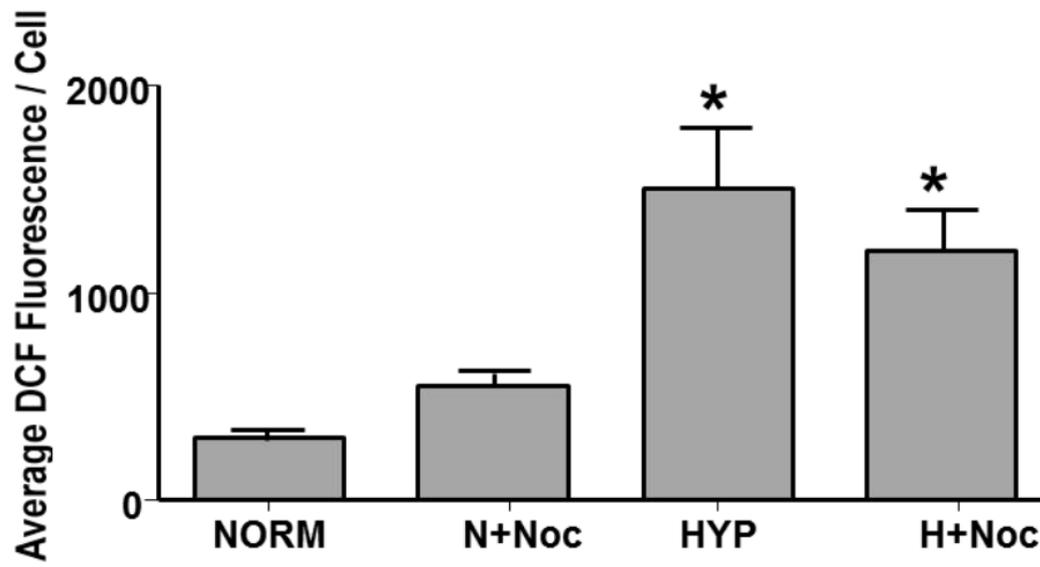
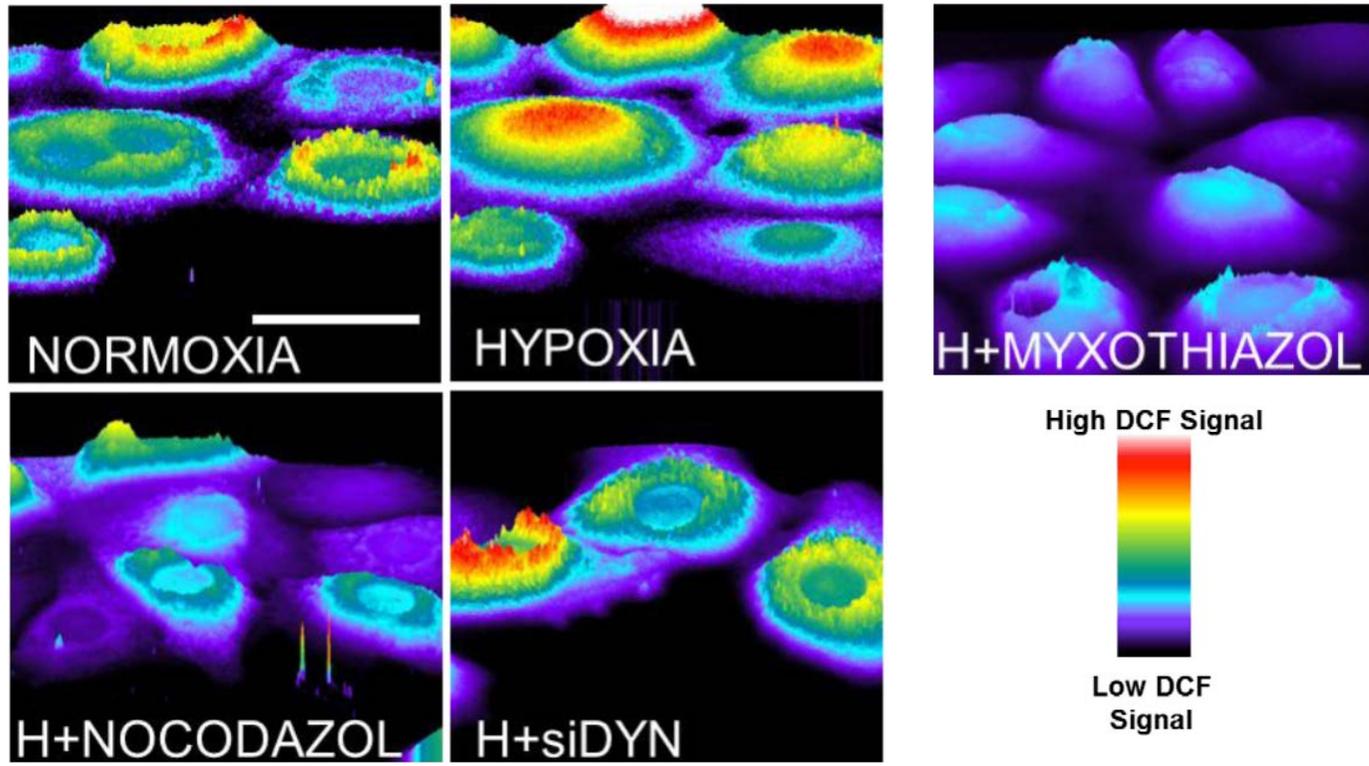
Baseline

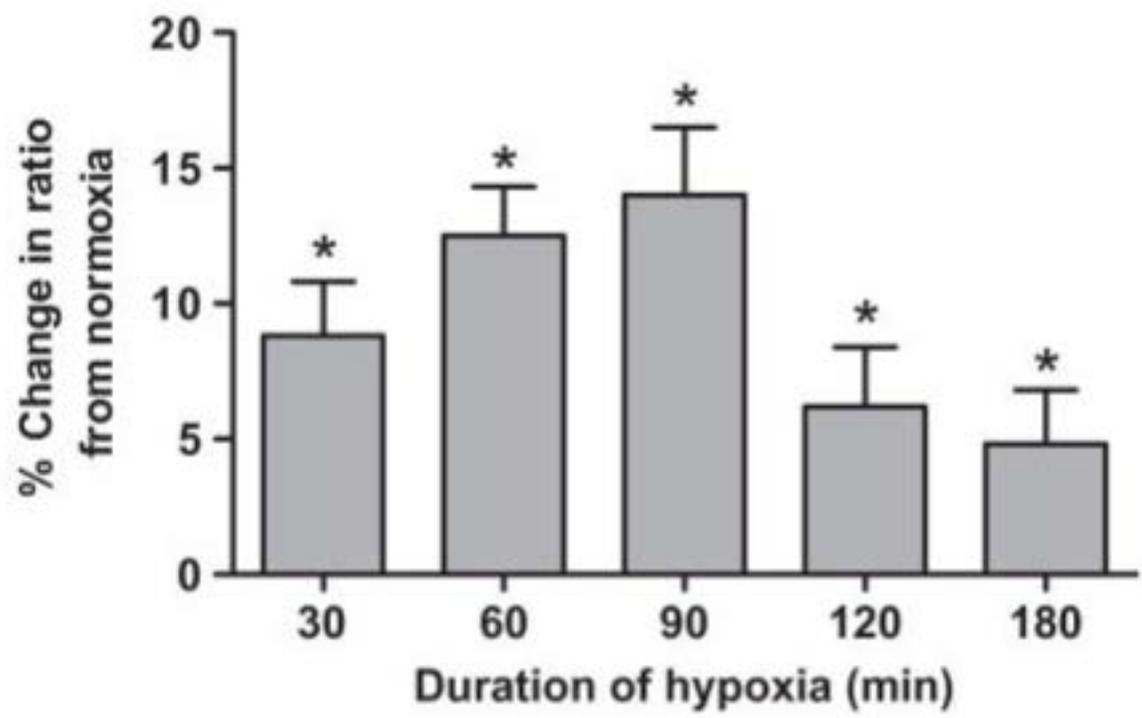
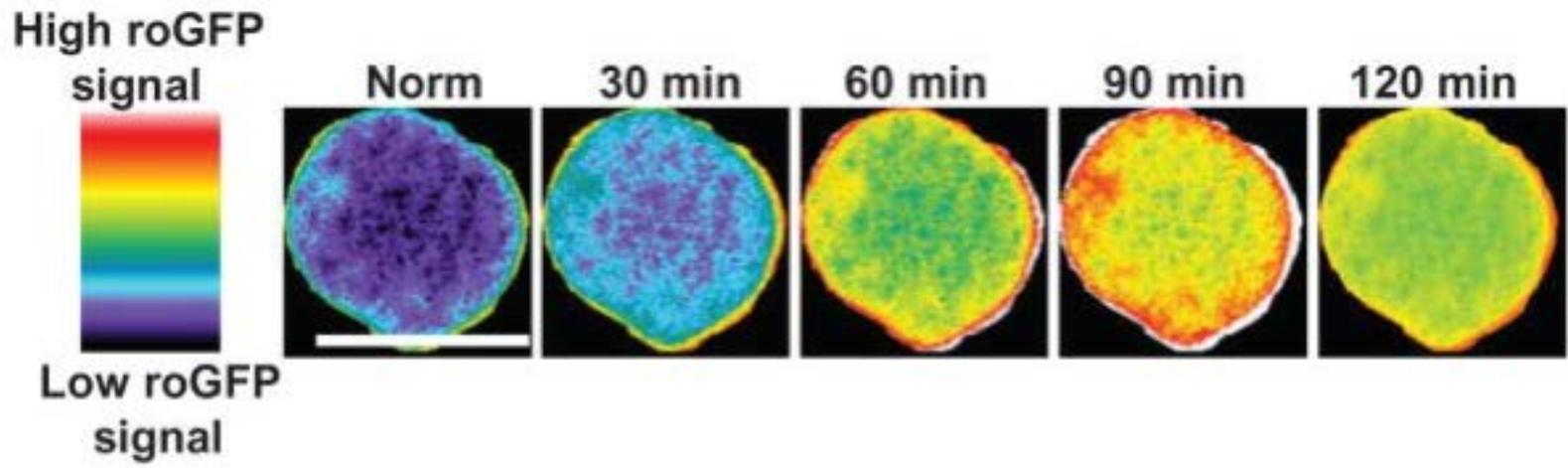
+DTT

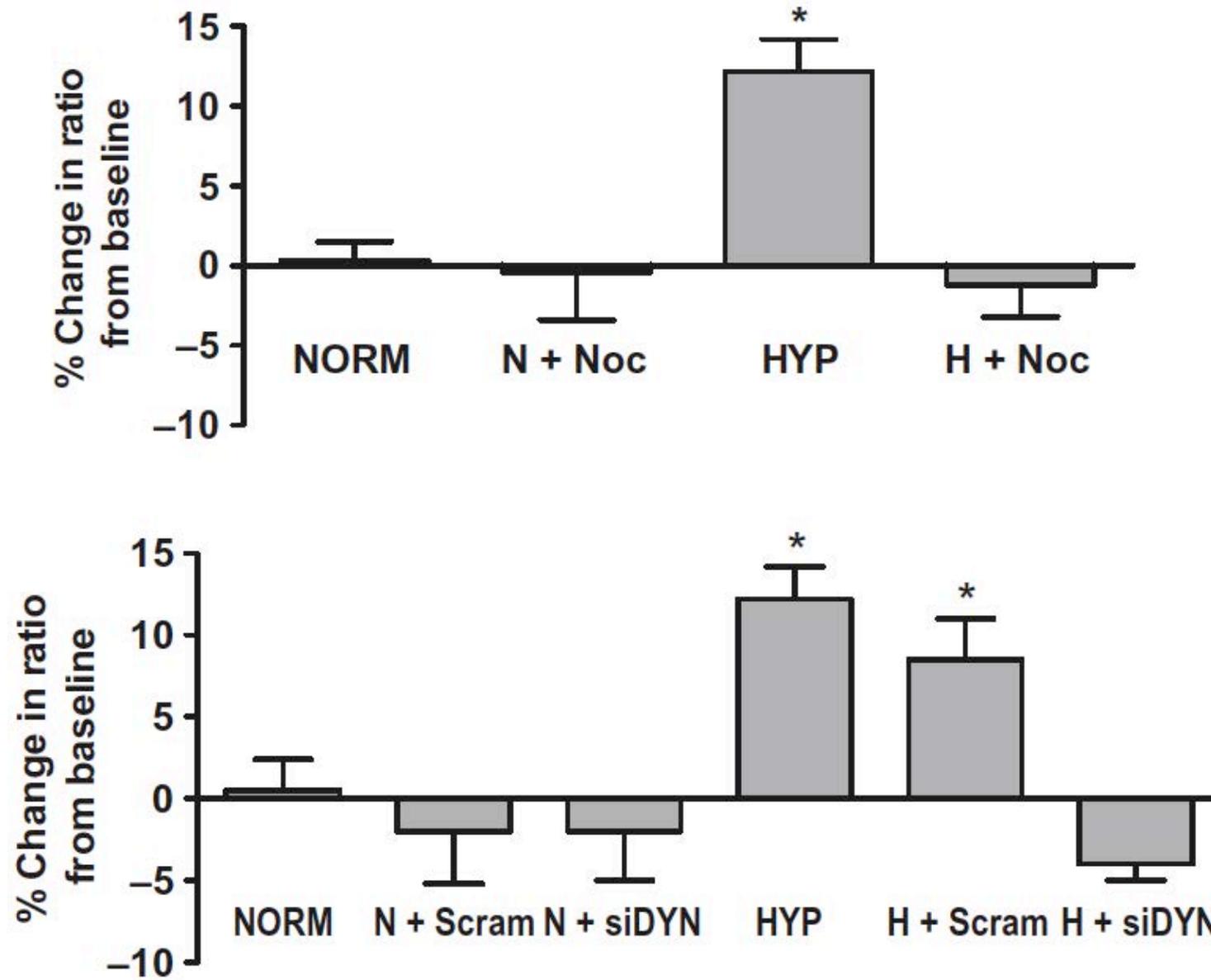
+tBOOH

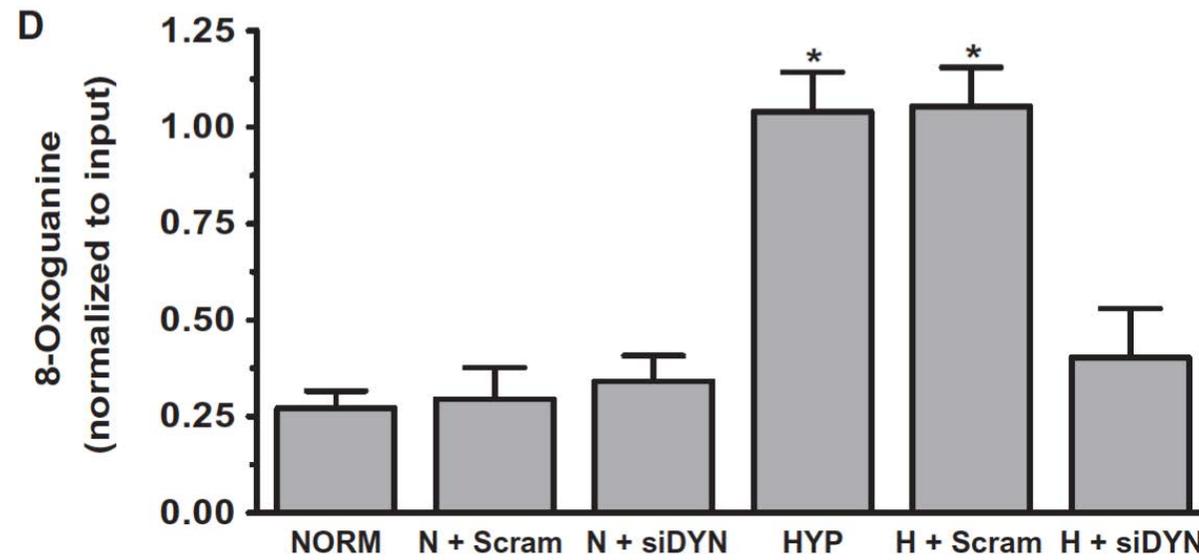
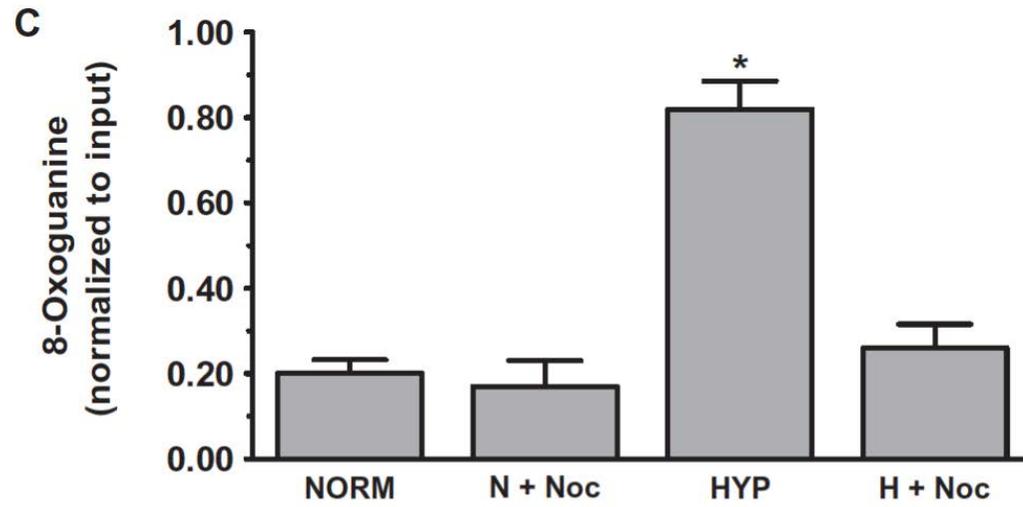
oxydée



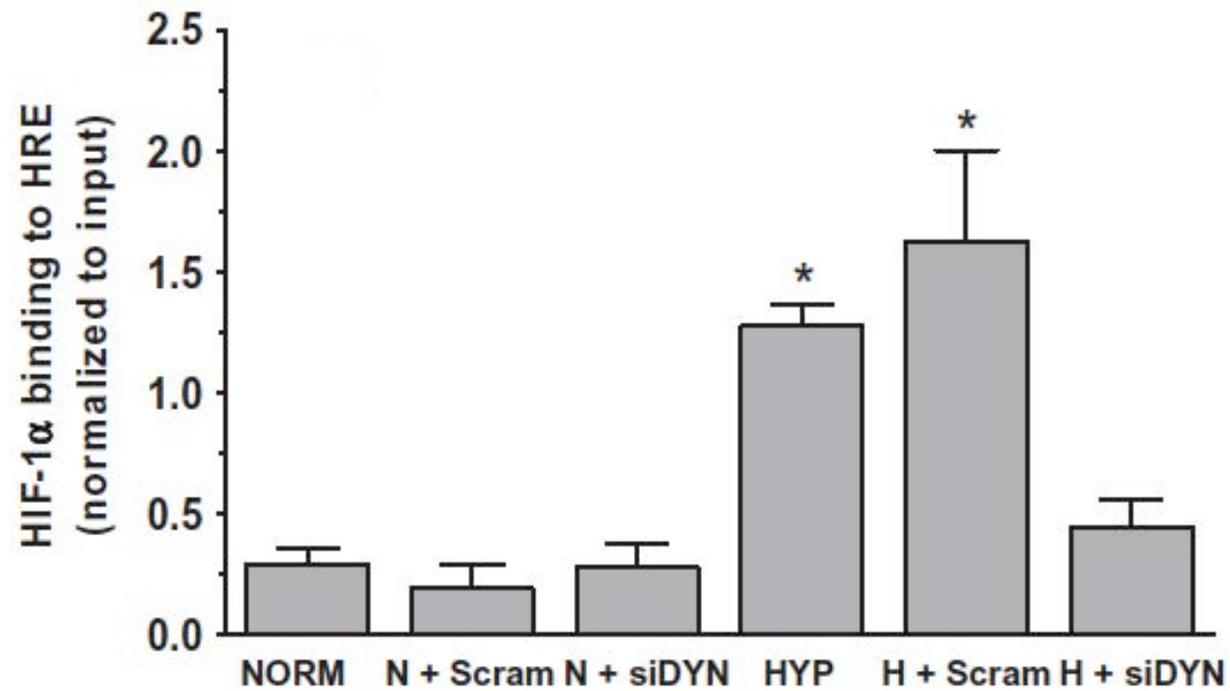
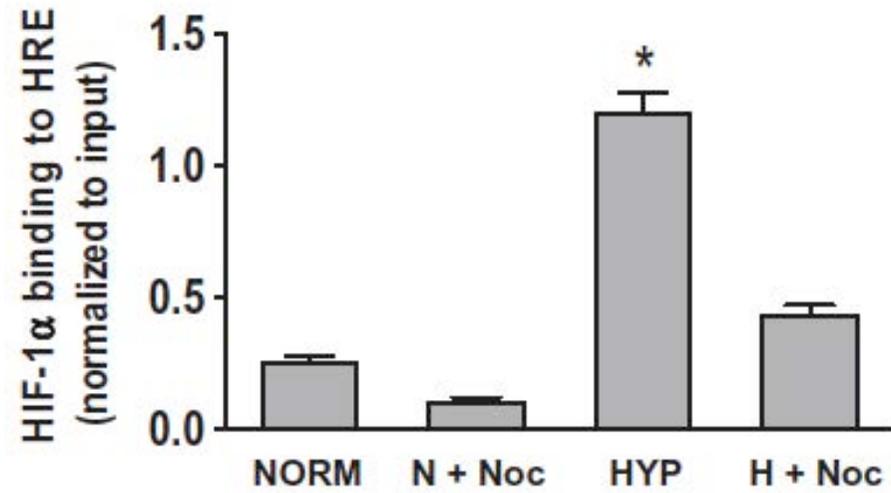


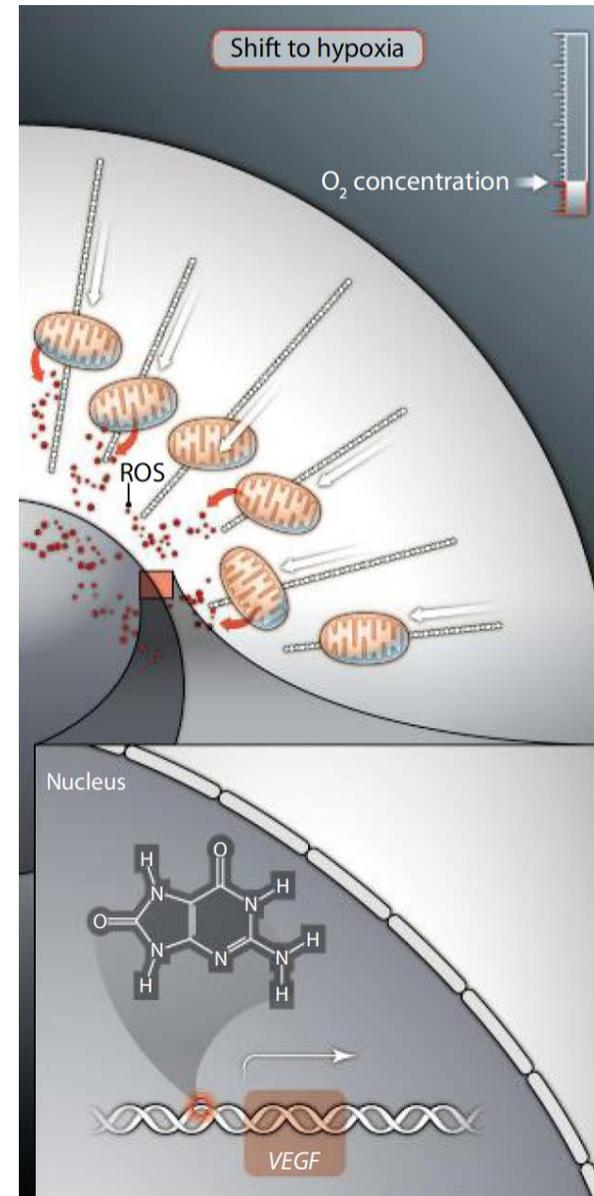
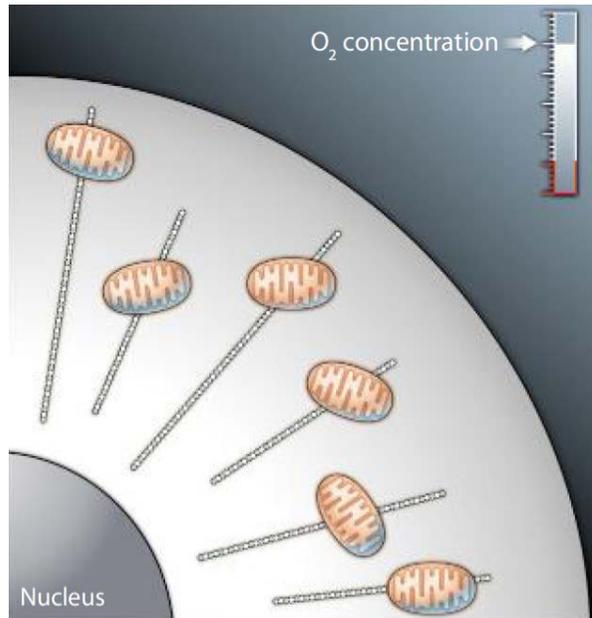






Mesure au niveau du promoteur



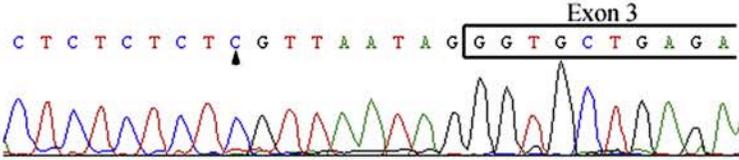
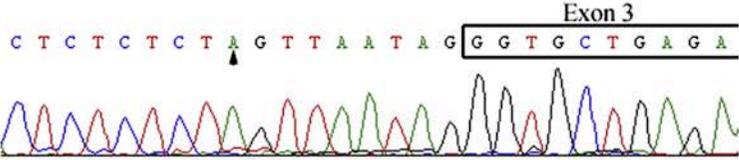


DFNB25

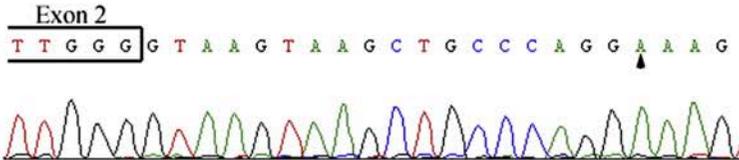
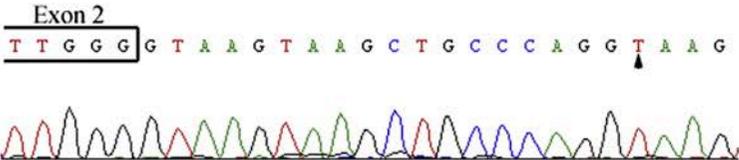
Patients

Controls

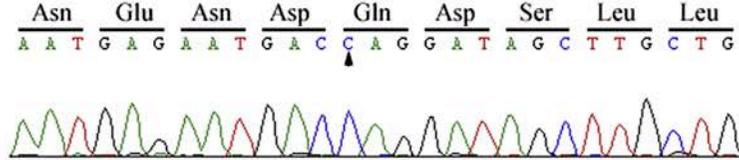
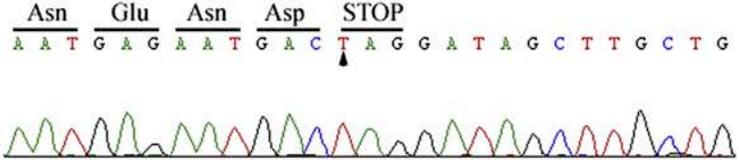
W98-053
c.628-9C>A
p.Gly210LeufsX5



W07-0122
c.627+19A>T
p.Gly210ValfsX14



DEM 4265
c.229C>T
p.Gln77X



DEM 4349
c.412C>T
p.Arg138Cys

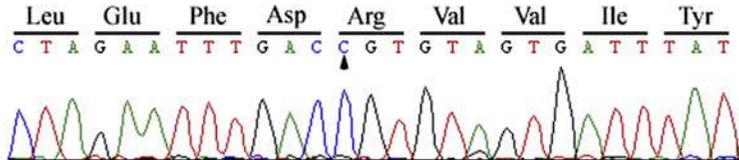
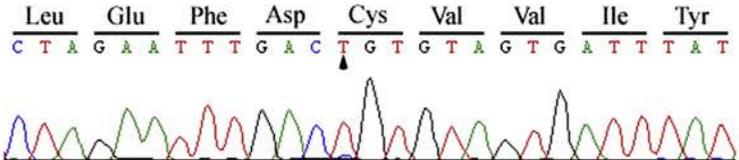
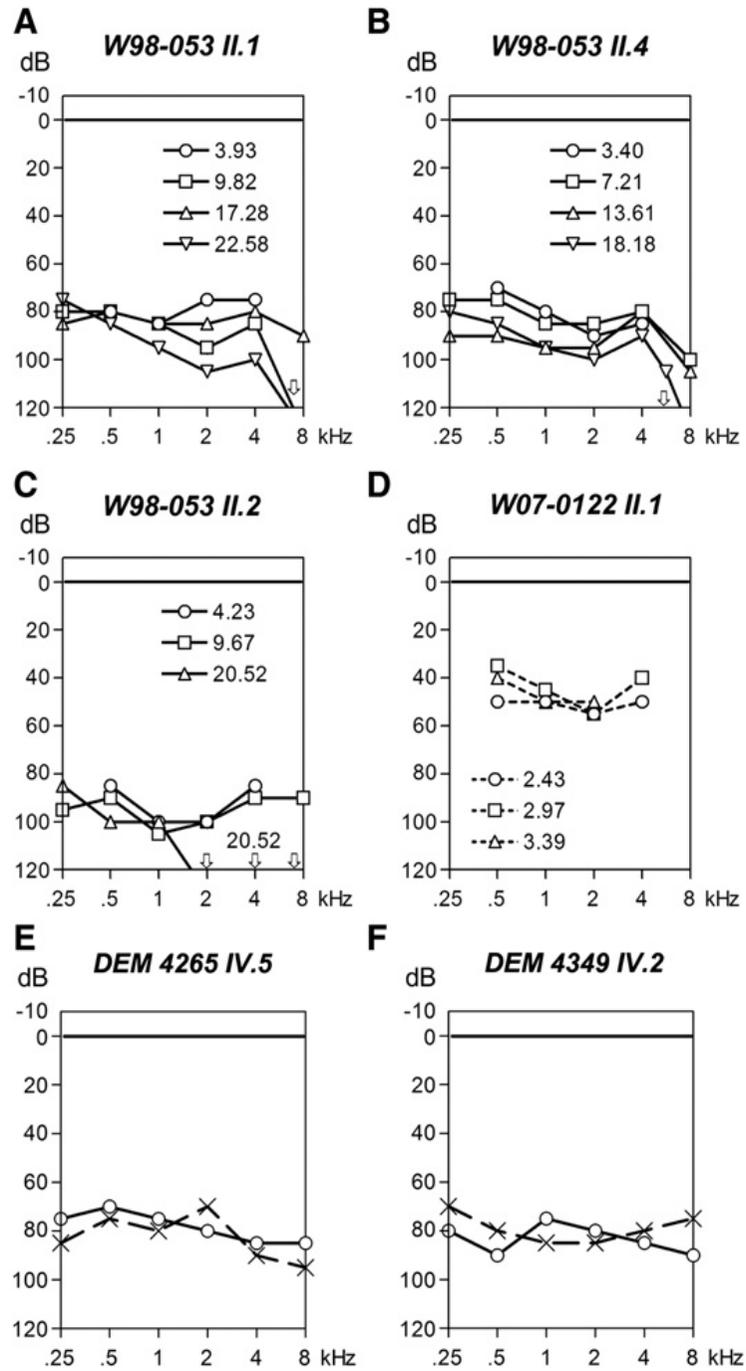


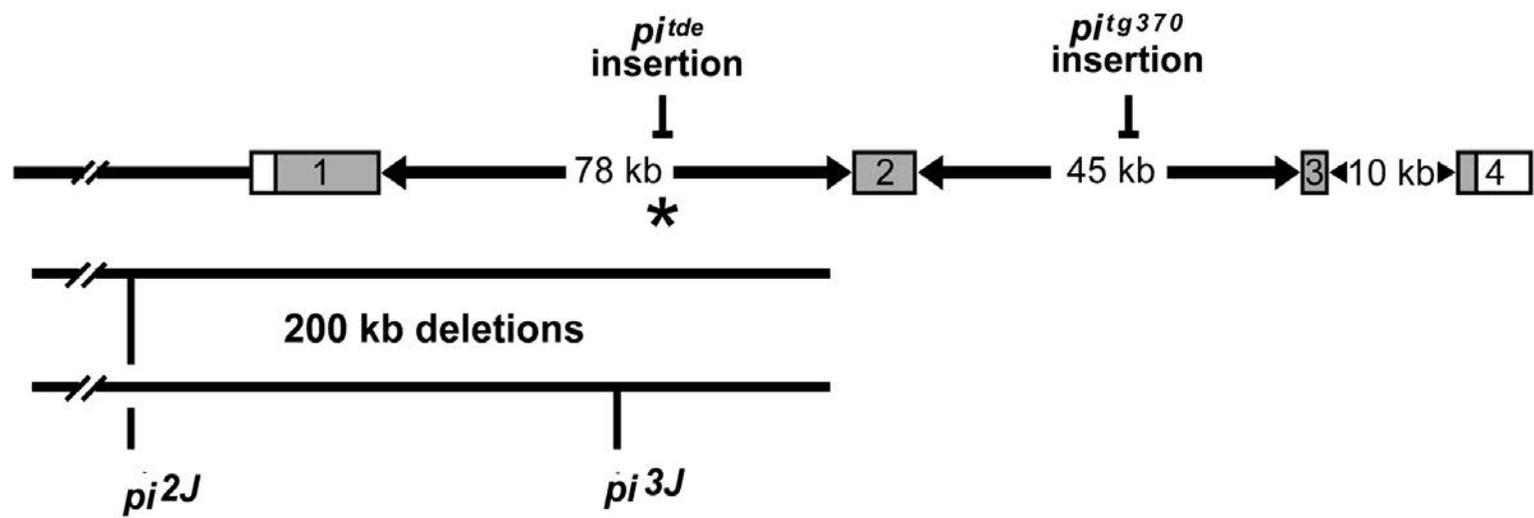
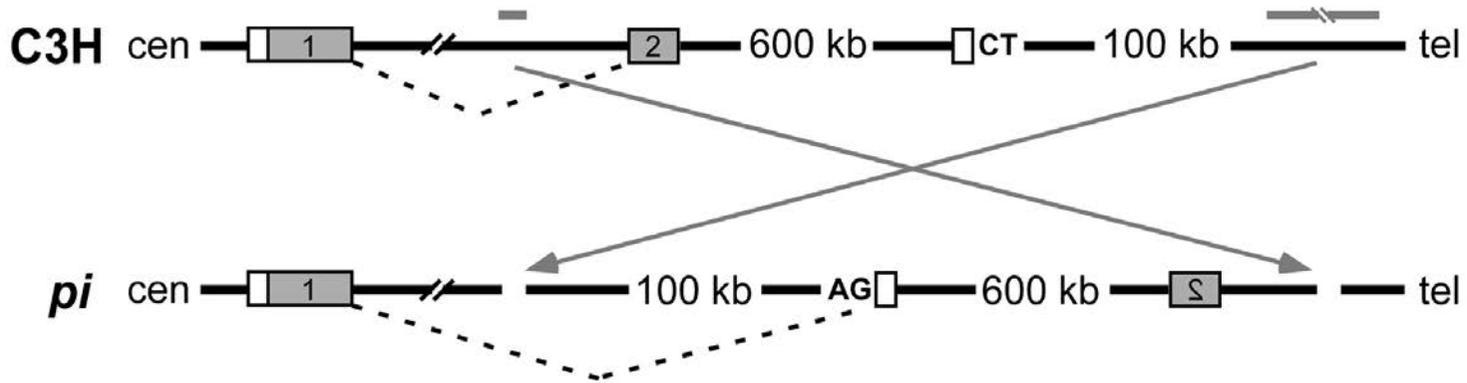
Table 2. Overview of the Predicted Splicing Effects of the GRXCR1 Mutations

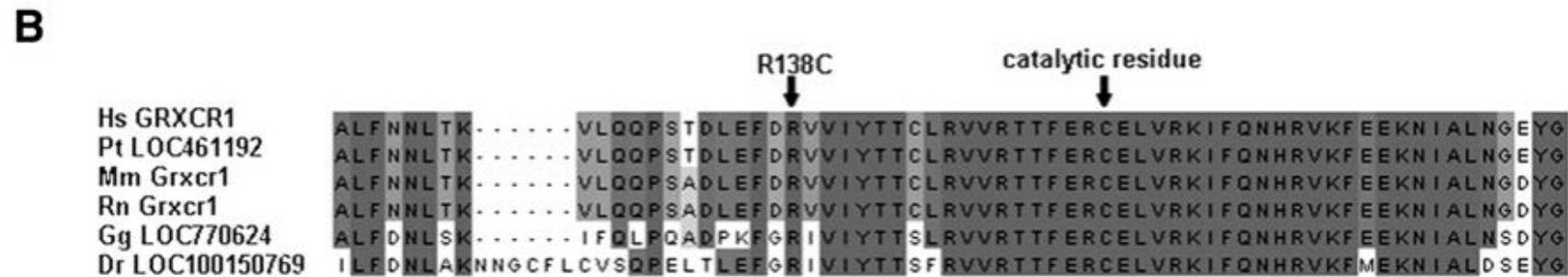
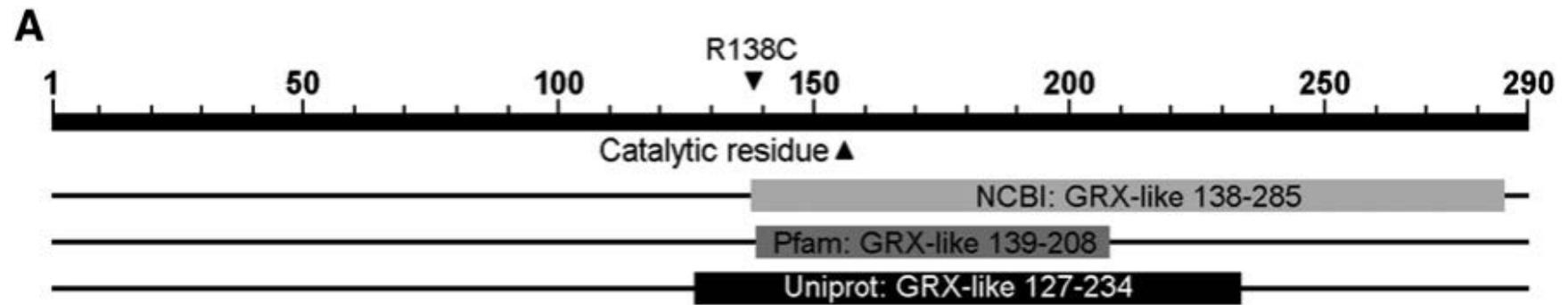
Family	Mutation	NNsplice	NetGene2	GeneSplicer	ESEfinder
W98-053	c.628-9C>A ^a	original splice acceptor site: 0.94	original splice acceptor site: 0.50	original acceptor splice site: 8.58	no changes
		novel splice acceptor site: 0.98	novel splice acceptor site: 0.28	novel splice acceptor site: 5.73	
W07-0122	c.627+19A>T ^b	original splice donor site: 1.00	original splice donor site: 1.00	original splice donor site: 3.08	no changes
		novel splice donor site: 1.00	novel splice donor site: 0.00	novel splice donor site: 5.26	
DEM 4265	c.299C>T	no changes	no changes	no changes	no changes
DEM 4349	c.412C>T	no changes	no changes	no changes	SC35 motif replaced by a SRp40 motif

^a With all splice-prediction programs, the original splice acceptor site is replaced by a novel splice acceptor site as a result of the c.628-9C>A mutation.

^b With all splice-prediction programs, the original splice donor site is predicted with an unchanged score, and a second splice donor site is predicted to be introduced by the c.627+19A>T mutation.





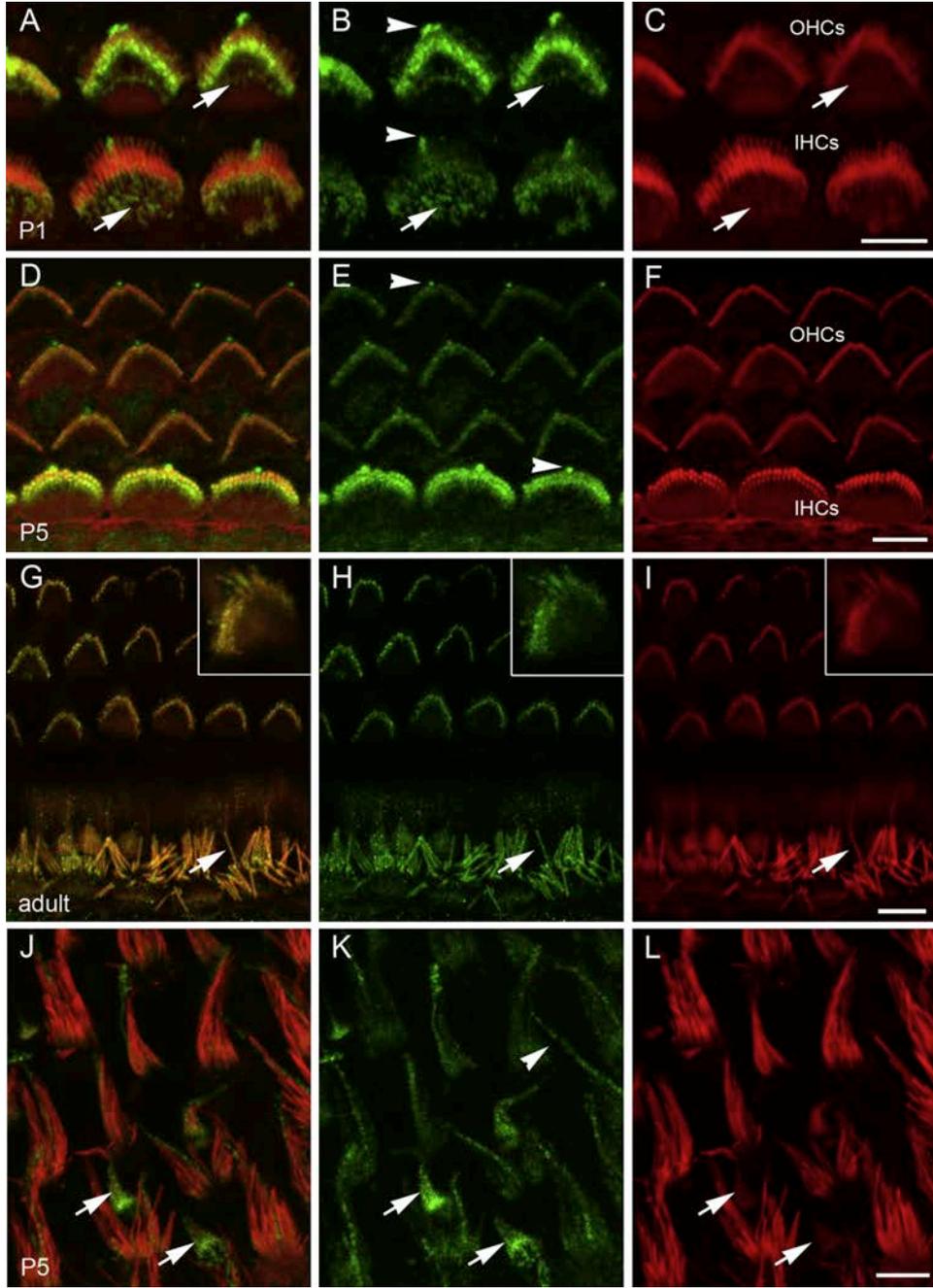


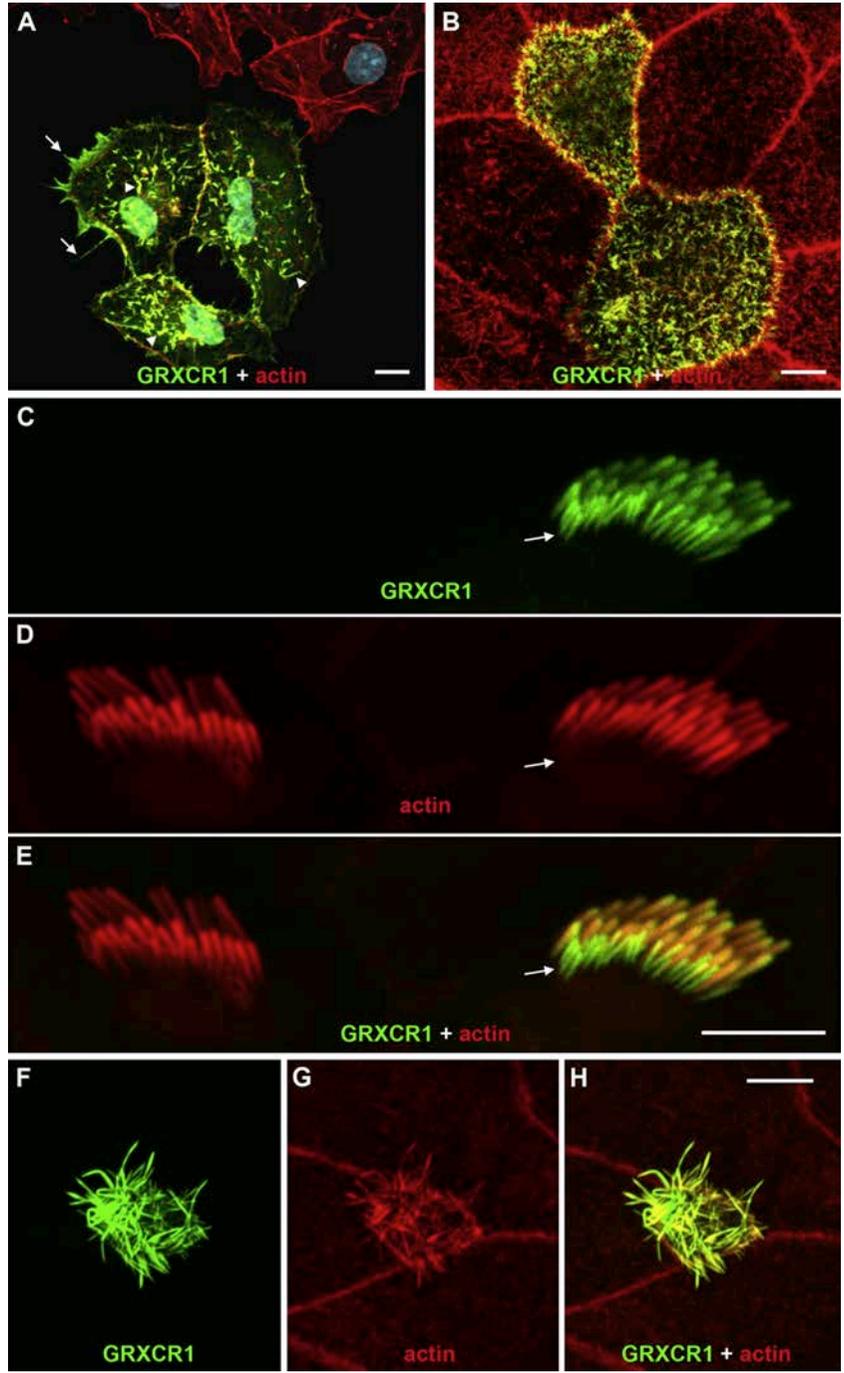
mouse GRXCR1
C. elegans (NP_497453)RRVNILSK.....NGTVRGVKYKVSAGQALFNNTKVLQOPPSADLEFDR:123
D. melano. (NP_570060)NGSVRGRKNLVKKA...LLKLDDRS...KNAGNSG: 62
A. gambiae (XP_310856) EDFVGFDIRTAGKLAGNSTIKSAKGTVIRGVKNRVRNGVATFLOLQQPNVKNYMEKDVGK:419
A. thaliana (NP_176631)NGTSTIRSNKGTVIRGVKNRVRNGIATFLOMQQTGMKNYKDKEAGK: 86
O. sativa (BAA92911) S.YSGPRSVKENIFVKRDRERREKEGNKKPVMN.W...DP...LREFPEKCPPGG.GEG:199
PELTGRRVVKDNPFLMRDREKNGNDGGAAAAARWRRRDP...FEGYPERRPPGASGGG:212

mouse GRXCR1
C. elegans (NP_497453) VVIYTTCLRVRVTTFERCELVRKIFON.....HRVKFEEKNIALNGDYGKELDER:173
D. melano. (NP_570060) VIIVYLTSCGVLRRSYDRCKNVTQLEA.....FRVKYEIRDLNISNFHVAELA EK:108
A. gambiae (XP_310856) VVLYTTSMGIIRDYAKCANVKKILRT.....LLIKFEERDIFMSVEYQQEMRER:469
A. thaliana (NP_176631) VVVYSTSMGIVRETYTKCANVKQILRT.....LLVKFEERDIFMSSEYQQEIRER:136
O. sativa (BAA92911) LIVYTTSLQGVRRTYEDCMRVRAIMEQ.....QGVVVDERDVSLDAGVLSSELKEL:248
VVLYTTTLRGVRRTFEDCERARKAVEACAEAVSAAGGSPVVVDERDVSLHGEYLRELRLGL:272

mouse GRXCR1
C. elegans (NP_497453) CRRVSEAPS.....LPVVFIDGHYLGGAEKILSMNESGELQDLLT.....KIERVQH:227
D. melano. (NP_570060) LKLNVEFQKDLIFDSLPLIYVDGYFLGNEKTIVELNDVKLLDNILG.....KYQNQAP:168
A. gambiae (XP_310856) ..MQDETIR.....VPQLFVEGQLIGDANIVERL NESGELRQLLR.....PYKSIAT:521
A. thaliana (NP_176631) ..MQSDTIN.....I PQVFVDGQHIGDAECIERL NESGELRKMLK.....PYKCLES:188
O. sativa (BAA92911) LQDEASVAP.....PRVFKGRYLGGAAEVTAMNENGLGRVLRWARVER...VGEEG:301
..AGAGDAP.....PRLFVMGRYLGGADACAELAESGKLREMMRWARARGEACA AKDG:323

* * * * *
mouse GRXCR1
C. elegans (NP_497453) PHECPSCGGFGLPCSVCHGSKMSVFRN...CFTDAF.KALKCTACNENGLQRCKNC.TC:290
D. melano. (NP_570060) SSVCSBECNRYIVCRMCHGSRRRHQONATSSVENPFGVLVLRCS SCDENGIARCEK.RN:235
A. gambiae (XP_310856) AYTCQTCCGYRMLPCPACNGSKKSMHRN...HFTA EF.VALKCMNCDEVGLIKCPNC...:582
A. thaliana (NP_176631) PYMCKVCCGYRLLPCPSCGGSKKSIHRN...HFTA EF.VALKCMNCDEVGLVKCHNC...:249
O. sativa (BAA92911) RLTCGCGGARWLPFCFECGGSCKVA AVGA.AKGER...WERCVKCNENGLIRCPVCFVN:368
R.GCEGCGGARFVPCWECGGSCKVVAAGATAAAD...VERCAKCNENGLMLCPIC..H:391





Comparison between antioxidant response elements in *GST*, *NQO1*, & *SOD1* genes

Species	Gene	Enhancer	5'-USR	Enhancer	
Rat	<i>GSTA2</i>	ARE	gctaa TGg	TGACaaAGCA	-687
Rat	<i>GSTA5</i>	ARE	gacac gGC	TGACagAGCg	-470
Rat	<i>GSTP1</i>	GPEI	agtca cta	TGAtTCAGCA	-2430
Mouse	<i>GSTA1</i>	EpRE	gctaa TGg	TGACaaAGCA	-719
Mouse	<i>GSTA3</i>	ARE	ctcag gca	TGACattGCA	-138
Mouse	<i>GSTA4</i>	n.c.	ctcag Taa	TGAgTCAGCg	-147
Mouse	<i>GSTM1</i>	n.c.	tgaac Ttg	TGACagtGCA	-1643
Mouse	<i>GSTM2</i>	n.c.	ggagt TGC	TGACaCAGgt	-202
Mouse	<i>GSTM3*</i>	n.c.	tgaac Ttg	TGACagtGCA	-2315
Mouse	<i>GSTP1</i>	ARE	caacg TGt	TGAgTCAGCA	-50
Mouse	<i>GSTP2</i>	n.c.	caacg TGt	TGAgTCAGCA	-61
Human	<i>MGST1</i>	EpRE	ggaca Tcg	TGACaaAGCA	-490
Rat	<i>NQO1</i>	ARE	agtca cag	TGACTtgGCA	-412
Mouse	<i>Nqo1</i>	ARE	agtca cag	TGAgTCgGCA	-426
Human	<i>NQO1</i>	ARE	agtca cag	TGACTCAGCA	-460
Human	<i>SOD1</i>	ARE	ataac Taa	TGACatttCt	-323
		ARE core		TGACnnnGC	
		T-MARE	TGC	TGACTCAGCA	

Main animal models of ARHL and related cochlear pathologies and pathogenesis

Strains	Age onset	Pathology	Pathogenesis main contributions	Main references
C57BL/6J-B6 (black) Ahl (locus on ch. 10)	Early onset	Degeneration of organ of Corti and afferent neurons	Sensory ARHL	Johnson et al. 1997
	Vulnerable to noise	Strial and ligamental degeneration: strial thinning<comma> ligament thinning<comma> loss of capillaries<comma> loss of fibrocytes. No EP decline.	Mixed sensory-neural-strial ARHL Genetic contribution (Cdh23ahl and Ahl3) Injury by ROS and apoptosis VEGF expression reduced Ohlemiller et al.<comma> 2009	Di Girolamo et al. 2001 Picciotti et al. 2004 Ohlemiller, 2006 Johnson et al. 2008
C57BL/6-Tyr(c-2J) (albino)	Early onset	Stria vascularis (marginal cell loss).	Strial ARHL	Keithley et al. 2004
			Genetic contribution (mutation of tyrosine Tyr locus on ch 7); Marginal cell fragility; absence of strial melanin; oxidative stress	Ohlemiller et al. 2009
B6.CAST-Cdh23CAST (albino)	Late onset	Degeneration of organ of Corti.	Sensory ARHL	Keithley et al. 2004
		No EP decline.	Genetic contribution (Cdh23ahl genotype).	Ohlemiller et al. 2009
CBA mice (pigmented)	Late onset	OHC and IHC progressive loss. SGN loss. No EP decline	Sensory-Neural ARHL Oxidative stress.	Li and Verkman, 2001 Ohlemiller, 2006
CBA/JAhl-resistant allele (pigmented)	Late onset	SGN degeneration.	Sensory-Neural ARHL	Keithley et al. 2004
		OHCs loss. No EP decline.	Oxidative stress.	Sha et al. 2008
CBA/CaJ (pigmented)	Late onset	Marginal cell degeneration	Strial ARHL	Ohlemiller et al. 2010 Ohlemiller et al. 2009
		Strial loss of capillaries, loss of outer sulcus. EP decline.	Reduced vascularization; ionic imbalance; oxidative stress.	Ohlemiller et al. 2010
NOD.NON-H2(nbl)/LtJ (albino)	Early onset	Strial capillary degeneration and subsequent strial atrophy.	Strial ARHL	Ohlemiller et al. 2008
			Microvascular pathology	Thomopoulos et al. 1997
BALB/cJ (albino) Ahl locus	Early onset Vulnerable to noise	Strial degeneration, marginal cell and ligament thickness decrease. EP decline.	Strial ARHL	Ohlemiller, 2006
			Genetic contribution Cdh23Ahl and injury by ROS. Absence of strial melanin.	
SAMP-1 (albino)	Early onset	SGN degeneration	Sensory ARHL? Autoimmune dysfunction T-cell mediated; Genetic contribution (Cdh23Ahl); ROS injury.	Usami et al. 1997 Iwai et al. 2003
CD-1 (albino)	Early onset	OHC loss, spiral ganglion degeneration. No EP decline.	Sensory/neural ARHL	Riva et al. 2007
DBA/2JAhI allele (pigmented)	Early onset	Hair cells and SGNs loss.	Hypoxia/ischemia: ROS formation; Apoptosis	Willott et al. 1995
			Sensory/neural ARHL Genetic contribution (L Cdh23ahl genotype), Oxidative stress , mtDNA mutations.	
129 S6/SvEv (Pigmented)	Early onset	Base to apex OHC loss; Fibrocytes dysfunction; middle ear pathology.	Sensory (conductive) ARHL	Johnson et al.2008 Ohlemiller and Gagnon 2004, Yoshida et al. 2000
			Noise resistant Oxidative stress.	Genetic contribution
Fisher 344 rat (albino)	Early onset	Strial degeneration, OHC loss; Changes middle ear impedance.	Strial (conductive) ARHL	Buckiova et al. 2006
			Loss K+ cycling;	Bielefeld et al. 2008a
			Reduced levels of prestin;	Chen et al. 2009
Sprague-Dawley rat (albino)	Late onset	SGN loss	Strial-Neural ARHL	Ohc apoptosis. Keithley and Feldman, 1982
Long Evans rat (pigmented)	Late onset	Absence of strial melanocytes and ligament fibrocytes.	Oxidative stress and intrinsic apoptotic pathway activation.	Nevado et al. 2006
		Reduction in the thickness of auditory cortex.	Central ARHL Oxidative stress (nitric oxide production).	Pouyatos et al. 2002 Ouda et al. 2003
Mongolian Gerbil (pigmented)	Late onset	Strial and ligamental degeneration; Modest hair cell and SGN loss. EP decline.	Strial ARHL Marginal cell loss; reduced K-ATPase activity; intrinsic apoptotic pathway activation	Gratton et al. 1997 Spicer and Schulte, 2002 and Spicer and Schulte, 2005

Onset of ARHL:

early: <12 months,

intermediate: 13–23 months,

late: >24 months of age