

Génétique et physiologie cellulaire

M^{me} Christine PETIT, membre de l'Institut
(Académie des Sciences), professeur

LES SYNAPSES CHIMIQUES : PHYSIOLOGIE ET DYNAMIQUE MOLÉCULAIRE *ASTROCYTES ET NEUROTRANSMISSION SYNAPTIQUE*

L'étude histologique du système nerveux central et celles portant sur son fonctionnement (analyse de l'information, codage, traitement et transfert du message) ont contribué à concentrer les recherches sur les neurones. Les cellules gliales, et parmi elles les astrocytes, ont été traditionnellement considérées comme des cellules ancillaires, qui assuraient en quelque sorte une maintenance multifonctionnelle pour permettre aux neurones d'effectuer leur noble tâche. Pourtant la phylogenèse indique un rôle majeur des astrocytes. En effet, la proportion des astrocytes par rapport aux neurones augmente de façon considérable durant l'évolution. Chez l'aplysie, un ganglion comporte typiquement 25 à 30 neurones et une cellule gliale. Chez le nématode, on compte en moyenne une cellule gliale pour 6 neurones. Dans le cortex du rat et de la souris, le rapport est inverse, avec 3 fois plus de cellules gliales que de neurones, et dans celui de l'homme, 4 fois plus. Depuis une dizaine d'années, notre vision du rôle des astrocytes s'est modifiée. Un nombre croissant de travaux ont mis en lumière le rôle essentiel des astrocytes dans la formation et le fonctionnement des synapses chimiques, d'où le choix du thème de ce cours.

Aspects historiques

« Je n'ai parlé que de la partie réellement nerveuse de ce système (nerveux central). Il est extrêmement important de connaître la substance qui se tient entre ces éléments proprement nerveux », écrivait Rudolph Virchow dans son ouvrage *Pathologie cellulaire*, publié en 1858. Cette substance, il la nommait « neuroglie ». Pourtant, dès 1851, Heinrich Müller avait décrit la première cellule gliale dans l'épithélium rétinien. En 1865, Otto Deiters caractérisa les premières cellules

gliales du cerveau. Le terme « astrocyte » fut introduit en 1893 par Michael von Lenhossek, en référence à l'aspect étoilé de ces cellules. Progressivement, ont été distinguées dans le système nerveux central, la macroglie et la microglie. La première comporte les astrocytes et les oligodendrocytes, tous deux d'origine neuro-ectodermique. La seconde, d'origine mésenchymateuse, est composée des cellules microgliales. Dans la substance blanche, la plupart des astrocytes sont dits « fibreux » et ont des prolongements peu ramifiés, qui s'étendent sur de grandes distances. Dans la substance grise au contraire, les astrocytes sont dits « protoplasmiques » et présentent de très nombreux prolongements courts et très ramifiés. Cependant, les astrocytes ont des caractéristiques communes : un corps cellulaire de faible diamètre (de 6 à 11 μm) avec de multiples prolongements cytoplasmiques souvent terminés par un renflement, le pied astrocytaire, qui définit une zone de contact avec d'autres cellules : astrocytes, oligodendrocytes, neurones et cellules endothéliales. L'étendue des prolongements astrocytaires est apparue progressivement avec l'évolution des techniques utilisées, passant de la mise en évidence de la protéine gliofibrillaire acide, GFAP, qui compose leurs filaments intermédiaires à la détection de la protéine S100 (porteuse du motif *EF hand* qui lie le Ca^{2+}), qui occupe davantage les prolongements astrocytaires, puis à la vectorisation d'un traceur fluorescent (GFP, *green fluorescent protein*), qui se répand dans toute l'arborisation astrocytaire. Les quatre types d'astrocytes qui constituent les modèles classiques d'étude de ces cellules, cellules de Müller de la rétine, glie de Bergmann du cervelet, astrocytes de l'hypothalamus et ceux de l'aire CA1 de l'hippocampe, ont été présentés.

Les astrocytes et la synaptogenèse

Le cours a d'abord porté sur la mise en évidence du rôle inhibiteur des astrocytes sur la formation de certaines synapses de l'hypothalamus, puis il s'est concentré sur leur rôle plus généralement activateur.

Les études du noyau supra-optique de l'hypothalamus, qui contient les neurones synthétisant l'ocytocine ou la vasopressine, ont montré une plasticité morphologique des rapports entre neurones et astrocytes, modulée par l'état physiologique. L'activation du système hypothalamo-hypophysaire en réponse à une déshydratation induit la sécrétion de la vasopressine, et la parturition, celle de l'ocytocine. Cette activation s'accompagne du retrait des prolongements astrocytaires qui séparaient les neurones, et l'apposition directe des membranes de neurones voisins est suivie de la formation de synapses.

Le plus souvent, on observe au contraire une activation de la synaptogenèse par les astrocytes, en particulier dans les cultures cellulaires de neurones et de glie provenant de la rétine, du cervelet ou de l'hippocampe. Cet effet activateur est à mettre en parallèle avec l'apparition concomitante d'une prolifération astrocytaire et d'une augmentation de la synaptogenèse dans les aires cérébrales correspondantes au cours du développement. L'effet des astrocytes sur les

synapses est à la fois quantitatif et qualitatif : augmentation du nombre des synapses, maturation et maintien de ces synapses (pré- et post-synapse). Ces trois effets sont observés sur la formation de synapses (autapses) par des neurones ganglionnaires de la rétine cultivés en présence d'astrocytes. L'activité électrique spontanée des neurones augmente. La maturation présynaptique se traduit par la structuration de la zone active (regroupement des protéines synaptiques), augmentation modérée de la densité des courants calciques et massive du nombre de vésicules synaptiques (test à l' α -latrotoxine ou en présence d'une solution hypertonique). La maturation post-synaptique se manifeste, elle aussi, par la structuration de cette région (suivie par différents marqueurs, tel que PSD-95). Des composants sécrétés par les astrocytes sont impliqués dans les fonctions susmentionnées. Les études des effets de milieux conditionnés par les astrocytes ouvrent la voie à la purification de ces molécules ; le cholestérol et la thrombospondine pourraient être impliqués. D'autres résultats montrent qu'un contact entre astrocytes et neurones est nécessaire à la synaptogénèse. Les techniques de vidéomicroscopie conjuguées à l'utilisation de marqueurs fluorescents des membranes des cellules vivantes (peptides myristoylés et palmitoylés couplés à la GFP), permettent de suivre le déplacement des prolongements astrocytaires et de visualiser les contacts qu'ils établissent, même transitoirement, avec les neurones. Ainsi, ont été corrélés dans des cultures de neurones hippocampiques, contacts astrocytaires et synaptogénèse. L'effet n'est pas restreint à la zone de contact entre neurones et astrocytes ; l'activation du neurone est globale et les synapses se forment en de multiples emplacements. La voie de transduction activée par le contact astrocytaire a été déchiffrée. Elle met en jeu l'activation de la protéine kinase C (PKC) ϵ par l'acide arachidonique, qui contrôle la translocation de cette kinase à la membrane ; l'augmentation de l'acide arachidonique provient de la stimulation de la phospholipase A2 dépendante du Ca^{2+} provoquée par le contact cellulaire. Des substrats de la PKC, comme MARCKS, dont on sait distinguer la forme phosphorylée (P-MARCKS) de la forme non phosphorylée par des anticorps, permettent de suivre l'activation de la PKC. En effet, MARCKS converti en P-MARCKS quitte la membrane plasmique car son domaine basique d'interaction avec la membrane devient chargé négativement. Corroborant l'ensemble des données, le traitement de neurones en l'absence d'astrocytes par le phorbol-1,2, 1,3-didécanoate, qui active la PKC, induit la synaptogénèse. La PKC a des substrats divers : on peut citer l'adducine et les spectrines, qui peuvent alors réorganiser le cytosquelette d'actine, étape indispensable à la formation des épines dendritiques.

Les astrocytes communiquent entre eux par des jonctions communicantes (*gap junctions*). À ce jour, le Ca^{2+} semble être le médiateur principal de la signalisation intra- et inter-astrocytaire. *In vivo*, en microscopie biphotonique et avec un traceur calcique fluorescent, on peut observer des fluctuations de la concentration calcique dans les astrocytes immatures (toutes les 2 à 6 minutes). *In vitro*, les variations de la concentration du Ca^{2+} dans les astrocytes peuvent être déclenchées

par une stimulation mécanique, électrique, ou chimique (neurotransmetteurs). L'élévation du Ca^{2+} peut être restreinte à une petite région, ou microdomaine astrocytaire. D'une taille de 2 à 3 μm , ces microdomaines correspondent à des territoires fonctionnels dans lesquels la concentration calcique s'élève lorsque les synapses qu'ils contactent libèrent des neurotransmetteurs. Les reconstructions tridimensionnelles effectuées au niveau des cellules de la glie de Bergmann indiquent qu'un microdomaine contacte en moyenne 5 synapses, dont il pourrait coordonner l'activité. L'élévation du Ca^{2+} peut aussi s'étendre à tout l'espace cellulaire. Elle peut être monophasique ou prendre la forme d'oscillations. Ces oscillations mettent en jeu le Ca^{2+} relargué du réticulum endoplasmique (blocage par la thapsigargine), et éliminé par les pompes calciques ou recapturé par les mitochondries. La fréquence de ces oscillations dépendrait donc de la géométrie cellulaire et de la distribution des organelles. Ceci implique l'existence de décodeurs moléculaires de ces fréquences, un rôle que l'on peut attribuer à certaines kinases. Certains facteurs de transcription phosphorylés par ces kinases changent de compartiment cellulaire et se déplacent vers le noyau ou vers le cytoplasme selon leur degré de phosphorylation, et donc la fréquence des oscillations. Les variations de Ca^{2+} peuvent aussi se propager d'une cellule à l'autre (sur 200 à 500 μm). Le mécanisme de cette propagation fait intervenir l'ATP extracellulaire. Les astrocytes possèdent des récepteurs-canaux activés par l'ATP, P2X, qui laissent passer les ions Ca^{2+} , et des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G, dont une sous-unité active la phospholipase C (PLC). La stimulation de la PLC produit à partir du $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, du diacylglycérol et de l' $\text{I}(1,4,5)\text{P}_3$. Ce dernier, en se fixant sur son récepteur à la surface du réticulum endoplasmique, permet la libération du Ca^{2+} , qui amplifie le signal calcique incident. À l'appui du rôle de l'ATP, les cultures d'astrocytes relarguent des bouffées d'ATP que l'on peut visualiser par imagerie bioluminescente (oxydation de la luciférine). Cet ATP serait d'origine vésiculaire, et son exocytose serait dépendante du Ca^{2+} . Une variante de ce mécanisme postule un mécanisme d'activation des cellules de proche en proche, non par un relargage séquentiel de l'ATP, mais par une simple diffusion extracellulaire de l'ATP.

Les astrocytes ont un potentiel de membrane fortement négatif (entre -70 et -75 mV). Ils expriment la quasi-totalité des canaux ioniques activés par la dépolarisation (Cl^- , K^+ ,...) et des récepteurs, ionotropiques et métabotropiques, activés par le glutamate (NMDA, AMPA et kainate), le GABA, l'ATP, la glycine, l'acétylcholine, présents dans les neurones, ainsi que des récepteurs aux hormones (ocytocine, vasopressine...). Pourtant, ils ne sont pas excitables car ils ne possèdent pas les canaux Na^+ ou Ca^{2+} nécessaires à la propagation d'une dépolarisation. L'astrocyte, contrairement au neurone, dégrade efficacement le glucose d'origine sanguine en glutamate. Il peut aussi utiliser le glycogène. Contrairement aux neurones, il recapture le glutamate, par ses transporteurs. Il convertit le glutamate en glutamine par la glutamine synthétase (dont les neurones sont dépourvus). Il libère la glutamine, que les neurones utilisent pour synthétiser du glutamate.

Rappelons que le glutamate, dégradé dans le cycle de Krebs, est aussi une source d'énergie importante. Ce cycle du glutamate entre astrocytes et neurones s'accompagne de deux demandes énergétiques majeures dans l'astrocyte, pour l'activation de la glutamine synthétase et de la pompe Na^+/K^+ . En effet, la capture du glutamate par l'astrocyte s'effectue grâce à un co-transporteur glutamate/ Na^+ , dont le bon fonctionnement nécessite l'évacuation concomitante du Na^+ de la cellule.

Les astrocytes et l'activité synaptique

Les premiers éléments du contrôle de l'activité synaptique par les astrocytes ont été décrits en 1994. La bradykinine, dont les récepteurs sont présents sur les astrocytes et non sur les neurones, augmente la concentration du Ca^{2+} dans les neurones. Les résultats obtenus suggéraient la séquence suivante : la bradykinine augmente la concentration intracellulaire du Ca^{2+} dans les astrocytes, qui libèrent alors du glutamate, qui se fixe aux récepteurs NMDA des neurones, provoquant l'entrée de Ca^{2+} . De nombreux travaux sont venus étayer le rôle des astrocytes dans l'activité synaptique. Nous avons illustré ce point par le rôle des astrocytes dans la fréquence des courants post-synaptiques dépendants des récepteurs AMPA (enregistrement sur tranches d'hippocampe), dont il a été montré qu'ils passent par la libération, par les astrocytes, de glutamate, qui, en se fixant sur les récepteurs mGluR1 présynaptiques (inhibition par le Ly267385 et le MPEP), augmente la probabilité de libération du glutamate par les neurones.

Puis, nous nous sommes intéressés aux courants post-synaptiques, entrants et retardés, tels que l'on peut les enregistrer dans les cellules pyramidales de l'aire CA1 de l'hippocampe, après stimulation des collatérales axonales des cellules pyramidales de l'aire CA3. Ces courants dits SIC (*slow inward current*), sont de faible fréquence, retardés (délai d'apparition de 90 ms après la stimulation), et ont une cinétique de disparition lente. Ils ne sont enregistrés que lors de stimulations intenses. Ils impliquent des récepteurs NMDA composés des sous-unités NR1/NR2B. On peut les obtenir par stimulation des récepteurs mGluR par un agoniste (DHPG), en l'absence de potentiels d'action (blocage des canaux Na^+ -dépendants du voltage, par la tétrodontoxine, TTX). Par conséquent, ces courants SIC sont provoqués par du glutamate qui ne provient pas des neurones. De fait, on peut les induire en élevant la concentration du Ca^{2+} dans les astrocytes. La libération du glutamate astrocytaire à l'origine des courants SIC stimule des récepteurs NMDA qui se trouvent dans la région extrasynaptique. Les courants SIC de neurones adjacents sont synchronisés. L'imagerie calcique permet de conclure que la réponse synchrone de plusieurs neurones est la règle. Ainsi, un astrocyte, par la proximité de ses prolongements avec la région extrasynaptique de plusieurs neurones, participerait-il à la synchronisation de leur activité.

Le mode de libération du glutamate par les astrocytes a longtemps suscité des interrogations. En effet, cette libération persiste en présence de toxine tétanique,

qui bloque la fusion vésiculaire. On s'est aperçu plus tard que les astrocytes n'ont pas de récepteur pour cette toxine. Aujourd'hui, un faisceau d'arguments permet d'établir que l'astrocyte libère du glutamate par une fusion vésiculaire dépendante du Ca^{2+} . Les vésicules peuvent être suivies sous microscope par l'expression d'une protéine SNARE du complexe de fusion, couplée à la GFP, et leur marquage à l'acridine orange. L'exocytose de l'acridine orange lors de la fusion vésicule-membrane plasmique peut être visualisée par la technique de TIR-FM (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*) et la libération du glutamate mise en évidence (cellules d'insulinome pancréatique).

À côté de la libération vésiculaire, dépendante du Ca^{2+} , du glutamate par les astrocytes, le glutamate peut quitter l'astrocyte par d'autres voies non vésiculaires et indépendantes du Ca^{2+} : transporteurs du glutamate fonctionnant en mode inversé, échangeur cystine-glutamate, canaux ioniques activés par le stress, récepteur de l'ATP (P2X7) et les hémicanaux jonctionnels formés d'hexamères de connexines.

Astrocytes et hémodynamique des vaisseaux cérébraux

La mise en évidence du rôle des astrocytes dans le contrôle du flux sanguin cérébral est très récente, mais déjà suffisamment documentée pour que l'on s'y attarde. Il est possible de suivre sur tranches de cerveau la dilatation/constriction des vaisseaux, et en parallèle le signal calcique dans les pieds astrocytaires à leur contact. Ainsi, la prostaglandine PGE2, vasodilatatrice, est libérée par les astrocytes activés par la stimulation neuronale. L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire dans l'astrocyte active la phospholipase A2 (PLA2) dépendante du Ca^{2+} (voir plus haut). L'acide arachidonique est converti en PGE2 sous l'action des cyclooxygénases. Stimulé, l'astrocyte a aussi une activité vasoconstrictrice sur les vaisseaux dilatés. L'acide arachidonique peut en effet être converti par des cytochromes (P450 et CYP4A) en acide 20-hydroxyecosatétranoïque (20-HETE), qui a une activité vasoconstrictrice. De plus, l'action vasodilatatrice du monoxyde d'azote (NO) produit par la NO synthétase lors de la stimulation neuronale, passerait par son rôle inhibiteur sur la production du 20-HETE.

Le lien entre activité neuronale et flux sanguin cérébral est à la base de l'interprétation de l'imagerie fonctionnelle cérébrale et en particulier, de l'imagerie fonctionnelle par résonance magnétique (IRM). Elle repose sur l'hyperémie fonctionnelle définie par le fait qu'une stimulation neuronale conduit à une vasodilatation. Il y a alors décroissance du champ magnétique intracérébral en rapport avec la baisse de la désoxyhémoglobine (aux propriétés paramagnétiques), dont la concentration diminue lorsqu'il y a augmentation du flux sanguin. Cette augmentation du flux sanguin est en général interprétée comme une conséquence directe de la consommation d'oxygène et de la dépense énergétique dans les tissus. Les travaux susmentionnés mettent en lumière le fait que l'hémodynamique des vaisseaux cérébraux mesurée par l'IRM fonctionnelle, est en fait contrôlée par l'activité des astrocytes.

L'IRM fonctionnelle reflète donc l'ensemble des paramètres qui contrôlent la signalisation calcique dans les astrocytes et les voies de biosynthèse et de sécrétion de ces vasomodulateurs.

Les astrocytes et la D-sérine

On tenait jusqu'à récemment pour acquis le fait que, si l'on trouvait chez les bactéries et les insectes certains acides aminés de type D (dextrogyre, c'est-à-dire déviant la lumière polarisée vers la droite), ceux des mammifères étaient tous de type L. Les acides aminés D n'ont jamais été observés dans la composition des protéines, faute, pense-t-on, d'enzymes capables d'établir des liaisons peptidiques entre eux. Chez les bactéries, ils entrent dans la composition des protéoglycanes qui composent la paroi bactérienne.

En 1986, est découverte la présence de D-aspartate dans le cerveau et dans d'autres tissus de mammifères. C'est une véritable surprise. En 1992, cette découverte est confirmée et étendue à un second acide aminé, la D-sérine. Dans le cerveau, la D-sérine représente un tiers du contenu total en sérine. En 1987, Philippe Asher avait montré que l'activité des récepteurs NMDA du glutamate requiert la présence d'un facteur qui est très probablement la glycine. En raison de l'analogie structurale de la glycine et de la D-sérine, l'hypothèse d'un rôle de la D-sérine dans l'activation des récepteurs NMDA a rapidement été testée. La D-sérine est associée aux prolongements astrocytaires et en particulier à ceux qui entourent les synapses qui possèdent les récepteurs NMDA composés des sous-unités NR2A/B. On la trouve également dans les prolongements astrocytaires proches des vaisseaux. Un ensemble de résultats ont permis d'établir que, comme la glycine, la D-sérine se lie, avec le glutamate, à ces récepteurs. L'intérêt biologique d'un double contrôle de l'activité de ces récepteurs continue de susciter des interrogations. Parmi elles, on retiendra le rôle proposé de la glycine et/ou de la D-sérine dans l'endocytose des récepteurs NMDA, et donc la régulation de leur trafic membranaire.

Des éléments du métabolisme de la D-sérine ont été décrits dès 1935. Krebs avait en effet découvert la D-aminoacide oxydase. Toutefois, cette enzyme n'avait pas retenu l'attention car, pensait-t-on, elle n'avait pas de substrat chez les mammifères. La découverte de la D-sérine conduisit rapidement à la mise en évidence de sa dégradation par cette enzyme. Les animaux dépourvus de cette enzyme ont en effet un taux élevé de D-sérine alors que celui de la glycine est normal. Les voies de la biosynthèse de la L-sérine, précurseur de la D-sérine ont été rappelées. L'une d'elles, dite voie phosphorylée, produit de la L-sérine à partir du glucose et du glutamate. L'autre consiste en un cycle glycine-sérine dans lequel le tétrahydrofolate intervient. Ces deux voies de synthèse de la L-sérine sont présentes dans les cellules astrocytaires. En 1999, l'enzyme qui convertit la L-sérine en D-sérine, la sérine racémase était purifiée. Elle présente une stricte spécificité de substrat et a pour coenzyme, comme beaucoup des enzymes de

transformation des acides aminés, le pyridoxal phosphate. L'activité de cette sérine racémase est tout à fait particulière. En effet, non seulement elle convertit la L-sérine en D-sérine, mais elle désamine la L-sérine en pyruvate. Cette activité de désamination est dépendante du pyridoxal phosphate, mais aussi de l'ATP et du Mg^{2+} . La stœchiométrie de la réaction enzymatique est la suivante : pour 4 molécules de L-sérine, on obtient 1 molécule de D-sérine et 3 molécules de pyruvate. Il s'agit de la seule enzyme dont l'activité produit, d'une part un composant de la transmission neuronale chimique, et d'autre part un substrat du métabolisme énergétique. Un lien a été établi entre les récepteurs AMPA, la protéine GRIP (*glutamate receptor interacting protein 1*), protéine sous-membranaire à domaine PDZ qui interagit avec les récepteurs AMPA et la sérine racémase. Il a été montré que, stimulés par le glutamate, les astrocytes augmentent leur production de D-sérine, *via* l'activation de GRIP. L'activation du récepteur AMPA induit la phosphorylation de GRIP, qui se dissocie alors de ses récepteurs et active la sérine racémase. Un rôle de la D-sérine dans la migration des neurones granulaires du cervelet a été montré.

En conclusion, les astrocytes sont, en quelques années, passés du statut de cellules ancillaires à celui d'authentiques partenaires du développement et du fonctionnement des neurones du système nerveux central et de leurs connexions synaptiques. En parallèle, leur rôle dans différentes maladies du système nerveux central est progressivement mis en évidence. A côté de leur pouvoir tampon du K^+ extracellulaire, évoqué depuis longtemps dans l'ischémie cérébrale, des arguments suggèrent qu'ils expriment l'érythropoïétine, qui bloque la mort neuronale, et qu'ils synthétisent glutathion et acide ascorbique, réducteurs des radicaux libres formés lors d'un stress oxydatif.

QUELQUES ÉLÉMENTS BIBLIOGRAPHIQUES

(Pour une bibliographie plus complète, voir le site de la chaire)

Bezzi P., Carmignoto G., Pasti L., Vesce S., Rossi D., Rizzini B.L., Pozzan T. & Volterra A. (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature*, 391, 281-285.

Fellin T., Pascual O., Gobbo S., Pozzan T., Haydon P.G. & Carmignoto G. (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron*, 43, 729-743.

Fiacco T.A. & McCarthy K.D. (2004) Intracellular astrocyte calcium waves *in situ* increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, 24, 722-732.

Hama H., Hara C., Yamaguchi K. & Miyawaki A. (2004) PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. *Neuron*, 41, 405-415.

Hatton G.I. (1997) Function-related plasticity in hypothalamus. *Annu. Rev. Neurosci.*, 20, 375-397.

Liu Q.S., Xu Q., Arcuino G., Kang J. & Nedergaard M. (2004) Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 3172-3177.

Lee S.W., Kim W.J., Choi Y.K., Song H.S., Son M.J., Gelman I.H., Kim Y.J. & Kim K.W. (2003) SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat. Med.*, 9, 900-906.

Mulligan S.J. & MacVicar B.A. (2004) Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature*, 431, 195-199.

Parpura V., Basarsky T.A., Liu F., Jęftinija K., Jęftinija S. & Haydon P.G. (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*, 369, 744-747.

Wolosker H., Sheth K.N., Takahashi M., Mothet J.P., Brady R.O., Jr., Ferris C.D. & Snyder S.H. (1999) Purification of serine racemase : biosynthesis of the neuro-modulator D-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 721-725.

Zonta M., Angulo M.C., Gobbo S., Rosengarten B., Hossmann K.A., Pozzan T. & Carmignoto G. (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat. Neurosci.*, 6, 43-50.

ACTIVITÉ DE RECHERCHE DU LABORATOIRE (2004-2005)

L'activité du laboratoire a deux objectifs très liés l'un à l'autre : (i) identifier les gènes dont le déficit est à l'origine d'une perte de l'acuité auditive chez l'homme, (ii) découvrir des mécanismes cellulaires et moléculaires qui soutiennent le développement et le fonctionnement de la cochlée, organe sensoriel de l'audition des mammifères. Après avoir utilisé les gènes de surdité comme points d'entrée dans une série de « modules » développementaux et/ou fonctionnels, le laboratoire met aujourd'hui en œuvre des approches complémentaires, tout particulièrement pour accéder à la transduction mécano-électrique auditive.

I. ISOLEMENT DES GÈNES RESPONSABLES DE SURDITÉ CHEZ L'HOMME

I.1. Isolement du gène responsable de la surdité DFNB59

Le gène responsable de la forme récessive de surdité DFNB59 a été isolé au laboratoire. Il code pour une protéine qui se lie au cytosquelette. L'inactivation du gène correspondant chez la souris est en cours. Un modèle murin qui reproduit la mutation faux-sens responsable de la surdité humaine a été généré au laboratoire. L'étude de ces souris mutantes, qui ont une baisse de l'acuité auditive, devrait permettre de comprendre la pathogenèse de cette surdité.

I.2. Les gènes impliqués dans la presbyacousie

Nous avons entrepris une étude génétique de la presbyacousie, surdité neurosensorielle progressive du sujet d'âge mûr qui prédomine sur les fréquences aiguës. La presbyacousie pourrait concerner 60 % des individus de plus de 70 ans, et constitue, par l'isolement social qu'elle entraîne dans les formes sévères, un problème de santé publique. Sa pathogénie est très mal connue. La part des facteurs génétiques, probablement sous-estimée, reste à évaluer, et les gènes en cause à découvrir. L'étude en cours a pour objectif d'identifier les gènes les plus fréquemment impliqués. Une centaine de familles concernées ont déjà été recrutées.

II. PHYSIOLOGIE MOLÉCULAIRE DE LA CELLULE SENSORIELLE : APPROCHE PAR LES GÈNES RESPONSABLES DE SURDITÉ

II.1. Touffe ciliaire

La touffe ciliaire, structure de réception du son, est composée de microvillosités rigides, les stéréocils. Elle se comporte comme une unité fonctionnelle. Les stéréocils sont unis par un lien apical (*tip link*), dont la mise sous tension par la stimulation sensorielle, provoque l'ouverture du canal de mécanotransduction. D'autres liens, qui unissent les stéréocils entre eux, ainsi que les stéréocils au kinocilium, ont été décrits, dont on ignore la fonction. L'identification des gènes de surdité a permis d'une part de mettre en évidence le rôle essentiel de certains de ces liens, et d'autre part, d'en révéler la nature moléculaire. La connaissance de cette dernière est essentielle à la compréhension de leur rôle. Elle permet d'approcher leurs propriétés biophysiques et en particulier leur élasticité, ainsi que celles des complexes moléculaires qui les couplent aux filaments d'actine qui emplissent les stéréocils. Elle peut révéler d'éventuelles activités enzymatiques associées à leur région intracytoplasmique et/ou un contrôle de leur activité par des modifications post-traductionnelles. D'autres gènes de surdité permettent d'accéder aux mécanismes moléculaires qui contrôlent la croissance des stéréocils, qui conduira à des rangées de stéréocils formant une structure en escalier, essentielle à la transduction sensorielle dans l'oreille interne.

II.1.1. Les liens de la touffe ciliaire

II.1.1.a. La stéréociline, défectueuse dans la surdité DFNB16 : un composant du lien qui solidarise le sommet de la touffe ciliaire des cellules ciliées externes avec la membrane tectoriale

Nous avons montré que les mutations du gène *STRC* sont responsables d'une forme récessive de surdité. Ce gène code pour une protéine de 1 809 acides aminés, sans homologie avec des protéines connues, contenant un peptide signal

probable et plusieurs segments relativement hydrophobes. Dans la cochlée, la stéréociline est détectée quelques jours après la naissance au niveau du kinocil et à l'apex des stéréocils des cellules ciliées externes. Le kinocil des cellules sensorielles cochléaires disparaît à partir du 7^e jour postnatal, mais la protéine persiste à l'extrémité apicale des stéréocils des cellules ciliées externes matures. Sur des membranes tectoriales isolées, la stéréociline est détectée au niveau des points d'ancrage des stéréocils les plus hauts. Dans les aires sensorielles du vestibule, la stéréociline est détectée dès la vie fœtale au niveau du kinocil. Après la naissance et chez l'adulte, la protéine est présente dans une structure non encore décrite, qui semble former un manchon autour du kinocil et se prolonger à travers les membranes acellulaires recouvrant le neuroépithélium, formant des sortes de « fibres » qui semblent s'enrouler autour des otoconies, les biominéraux qui reposent sur ces membranes acellulaires.

L'un des ligands potentiels de la stéréociline, que nous avons obtenu par le système double-hybride dans la levure, a été étudié : la métallocalcarboxypeptidase, CPX-2. Cette protéine comprend un peptide signal potentiel, un domaine discoïdine, et un domaine carboxypeptidase qui n'a probablement pas d'activité enzymatique (plusieurs résidus considérés comme essentiels pour l'activité carboxypeptidase sont substitués). Nous avons établi que la protéine CPX-2 recombinante produite par des cellules transfectées est sécrétée dans la matrice extracellulaire. Dans l'oreille interne, nous avons détecté CPX-2 dans les membranes acellulaires recouvrant les épithéliums sensoriels : membrane tectoriale, membranes otoconiales et cupules ampullaires. Elle est colocalisée avec la stéréociline lorsque cette dernière entre en contact avec les membranes acellulaires.

Nos différents résultats suggèrent plusieurs fonctions possibles pour la stéréociline dans l'oreille interne : l'ancrage des membranes acellulaires aux cellules sensorielles, le maintien de la cohésion des touffes ciliaires (en particulier pour les cellules ciliées externes) et la protection contre le stress mécanique. L'analyse des souris déficientes en stéréociline, que nous avons générées, devrait nous permettre de valider tout ou partie de ces fonctions.

II.1.1.b. Les protéines codées par les gènes défectueux dans le syndrome de Usher de type I et les liens interstéréociliaires

À partir de l'étude de trois protéines, myosine VIIa, harmonine (protéine à domaines PDZ) et cadhérine-23, défectueuses chacune dans une forme génétique du syndrome de Usher de type I (association d'une surdité congénitale et d'une rétinopathie pigmentaire évoluant vers la cécité), nous avons proposé un scénario moléculaire dans lequel ces protéines interagissent pour maintenir la cohésion de la touffe ciliaire en croissance. Ce réseau a été enrichi de la protocadhérine-15 et de la protéine SANS (protéine associée au cytosquelette, composée d'un domaine SAM et de 3 répétitions ankyrine), toutes deux défectueuses dans deux autres formes génétiques du syndrome de Usher de type I. SANS interagit avec

l'harmonine et la myosine VIIa, et la protocadhérine-15 avec l'harmonine. La localisation de SANS sous la touffe ciliaire, associée aux vésicules, indique qu'elle contrôle le trafic de certaines protéines adressées à la touffe ciliaire. De fait, elle est, comme la myosine VIIa, requise pour le ciblage de l'harmonine dans la touffe ciliaire.

Par ailleurs, nous avons établi par immunofluorescence en microscopie optique et en microscopie électronique, que la cadhérine-23 est un constituant de liens interstéréo-kinociliaires et interstéréociliaires latéraux dans la touffe ciliaire en croissance. En nous fondant sur les analyses morphologiques faites par d'autres groupes, nous avons conclu au rôle essentiel de ces liens composés de cadhérine-23 dans la cohésion de la touffe ciliaire en croissance. Nous avons toutefois entrepris une analyse morphologique détaillée des anomalies du développement de la touffe ciliaire chez les différents souris mutantes défectueuses pour chacune des protéines impliquées dans ce syndrome. Cette étude est couplée à une analyse de la variation des profils d'expression de ces protéines au cours du développement normal et chez les divers mutants, réalisée par immunofluorescence sur explants d'organe de Corti aux différents stades. Les résultats préliminaires nous conduisent à impliquer les protéines USH1 dans de nouvelles fonctions.

II.1.1.c. L'usherine, défectueuse dans le syndrome de Usher de type II est un composant de liens interstéréociliaires basaux

Nous avons montré que la forme transmembranaire de l'usherine, dont le déficit est responsable de la forme USH2A, comporte une variété d'isoformes. Un ensemble de données, profil d'expression dans la cochlée et le vestibule, composition moléculaire, interaction avec l'harmonine et la whirline, indique que l'usherine participe sans doute à la constitution des liens interstéréociliaires basaux transitoires, qui seraient ancrés aux filaments d'actine des stéréocils *via* l'harmonine et la whirline.

II.1.2. Croissance des stéréocils

L'interaction de la whirline (protéine à domaines PDZ) et de la myosine XVa, dont les déficits génétiques conduisent dans les deux cas à des stéréocils de taille anormalement petite, a été mise en évidence. Une analyse par immunohistofluorescence a montré que les deux protéines sont colocalisées à l'extrémité distale des stéréocils au cours de la croissance de la touffe ciliaire. Différents tests de liaison *in vitro* ont confirmé l'interaction directe entre ces protéines et précisé les domaines protéiques impliqués. Les résultats indiquent que l'interaction de ces deux protéines au sommet du stéréocil est essentielle au contrôle de sa croissance.

II.2. Synapse — Caractérisation biochimique et fonctionnelle de l'otoferline

Contrairement à la synapse classique du système nerveux central où la libération de neurotransmetteur est phasique et contrôlée par un potentiel d'action qui répond à la loi de « tout ou rien », la synapse à rubans de la cellule ciliée interne de la cochlée a la capacité de libérer son neurotransmetteur d'une manière à la fois phasique et tonique, même lors d'un stimulus sonore prolongé. Les composants moléculaires à l'origine de cette propriété unique sont inconnus. La compréhension des mécanismes moléculaires gouvernant ces caractéristiques fonctionnelles reste un défi majeur pour comprendre la fonction auditive. Le petit nombre de cellules ciliées internes que contient la cochlée exclut l'usage de techniques standard de biochimie ou de biologie moléculaire. Ainsi, l'identification de gènes responsables de surdité codant pour des protéines impliquées dans le trafic des vésicules synaptiques ou leur exocytose semble une approche prometteuse. Nous avons identifié l'otoferline, une protéine transmembranaire à domaines C2, déficiente dans la forme récessive de surdité humaine DFNB9. Par immunofluorescence, nous avons observé que la distribution de l'otoferline dans la cochlée mature de souris est restreinte aux cellules ciliées internes, et que son expression durant le développement est parallèle à la synaptogenèse. En utilisant la microscopie électronique et l'immunodétection à l'or colloïdal, nous avons observé que l'otoferline est localisée autour des rubans (structures caractéristiques des zones actives des synapses des cellules ciliées internes) ou associée à la membrane présynaptique. L'otoferline interagit directement avec la syntaxine-1 et SNAP25, deux protéines du complexe SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*), d'une manière dépendante du Ca^{2+} . Nos résultats suggèrent que l'otoferline est un détecteur de Ca^{2+} qui module la libération du neurotransmetteur par la cellule ciliée interne. L'inactivation du gène que nous avons réalisée chez la souris, nous permet de conclure que l'otoferline est une protéine indispensable à la fusion entre vésicule et membrane plasmique. Tout indique qu'elle est le détecteur calcique de la phase d'exocytose finale. Le modèle animal reproduit fidèlement l'atteinte auditive observée chez l'homme.

II.3. Identification des ligands de KCNQ4, un canal potassique localisé à la base des cellules ciliées

Des mutations dans le gène codant pour le canal potassique KCNQ4 sont responsables d'une forme dominante de surdité, DFNA2. Nous avons identifié plusieurs ligands potentiels de KCNQ4. L'un d'eux, KCNQBP1 (*KCNQ Binding Protein 1*), une protéine transmembranaire sans homologie avec des protéines connues, est en cours de caractérisation. Les tests de liaison *in vitro* montrent que KCNQ4 interagit directement avec KCNQBP1. Par immunohistofluorescence, nous avons détecté KCNQBP1 dans les cellules ciliées cochléaires et vestibulaires. Des données électrophysiologiques préliminaires indiquent que

KCNQBP1 modifie les propriétés de conductance et la cinétique d'ouverture du canal KCNQ4.

III. PHYSIOLOGIE MOLÉCULAIRE DE LA CELLULE SENSORIELLE — AUTRES APPROCHES

III.1. Transduction mécano-électrique

III.1.1. Identification de ses composants moléculaires

Les cellules sensorielles de la cochlée échappent à l'analyse moléculaire par les méthodes classiques en raison de leur petit nombre, environ 12 000. L'identification des gènes défectueux dans diverses formes de surdité a certes permis de décrypter une partie des mécanismes moléculaires du contrôle de la croissance, de l'orientation et de la cohésion de la touffe ciliaire des cellules ciliées de l'oreille interne, mais elle n'a pas permis d'accéder au complexe de transduction mécano-électrique. Ce complexe est organisé autour d'un canal cationique non sélectif, qui n'a pas encore été identifié avec certitude. Un criblage d'une soixantaine de canaux cationiques non sélectifs a donc été entrepris par la technique de RT-PCR sur cellule sensorielle unique. Ce criblage s'est focalisé sur trois familles de canaux : TRP (*transient receptor potential*), KCNK, et HCN. Parmi la soixantaine de molécules testées par cette technique chez la souris durant les deux premières semaines postnatales, 16 transcrits ont été détectés dans les cellules ciliées cochléaires. L'obtention d'anticorps nous a ensuite permis de localiser plusieurs de ces canaux dans la touffe ciliaire de ces cellules. Pour trois de ces gènes, la production de souris mutantes est en cours.

III.1.2. PHR1, un ligand commun aux myosines 1c et VIIa, deux moteurs moléculaires impliqués dans le processus d'adaptation

Des travaux récents indiquent que la myosine 1c et la myosine VIIa interviendraient dans le processus de l'adaptation lente en relâchant la tension qu'elles sont supposées exercer, directement ou indirectement, sur le canal de transduction mécano-électrique. Afin de comprendre comment la myosine 1c exerce sa fonction dans la touffe ciliaire, nous avons entrepris d'identifier ses partenaires de liaison. La queue de la myosine 1c a été utilisée comme appât pour cribler une banque « double-hybride » issue de l'oreille interne de souris. Parmi les ligands potentiels identifiés, nous nous sommes intéressés à la protéine PHR1, qui comporte quatre isoformes prédites, contenant toutes un domaine PH (*pleckstrin homology*) et un domaine transmembranaire C-terminal. Nous avons montré l'interaction directe entre PHR1 et les myosines 1c et VIIa *in vitro*. De plus, en purifiant PHR1 par filtration sur gel et en analysant la fraction résultante par spectrométrie de masse, nous avons montré que PHR1 se dimérise par son domaine PH. Les différents anticorps anti-PHR1 que nous avons utilisés ne nous

ont pas permis de mettre en évidence une immunoréactivité spécifique dans la touffe ciliaire. En revanche, le marquage ponctiforme du corps cellulaire est compatible avec un rôle de la protéine dans le trafic vésiculaire.

III.2. La kinociline, une protéine du kinocil

Nous avons caractérisé un ADNc murin, *Kino*, codant une petite protéine de 124 acides aminés. Cette protéine, initialement détectée dans le kinocil des cellules sensorielles, a été nommée kinociline. Elle est également présente dans le cytoplasme des cellules sensorielles de la cochlée et du vestibule. À partir de 12 jours post-natals chez la souris, le kinocil a disparu des cellules sensorielles de la cochlée et la kinociline se redistribue à l'apex des cellules sensorielles, d'une part autour de la plaque cuticulaire (région riche en actine), où elle est co-localisée avec un anneau microtubulaire, et d'autre part au sein même de la plaque cuticulaire, en regard de chaque stéréocil. Ces observations suggéraient que la protéine pouvait être associée à certains réseaux microtubulaires de ces cellules. Parce que les régions dans lesquelles la kinociline est présente sont des zones d'intense trafic vésiculaire, et parce que la protéine possède des domaines transmembranaires, la kinociline pourrait être impliquée dans le transport de vésicules.

Nous avons produit des souris génétiquement déficientes pour le gène *Kino*. L'analyse phénotypique de ces souris est en cours.

IV. RÔLE DES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LE FONCTIONNEMENT COCHLÉAIRE

Les connexines sont les constituants des canaux jonctionnels communicants (*gap junction channels*) qui permettent l'échange entre deux cellules de molécules d'une masse inférieure à 1 kDa (ions, métabolites, seconds messagers). Elles jouent un rôle essentiel dans l'audition. En effet, des mutations dans différentes connexines (*CX26*, *CX30*, *CX31*, *CX43*) sont responsables de surdités isolées et/ou syndromiques chez l'homme. Afin de comprendre le rôle des jonctions communicantes dans l'audition, nous produisons et caractérisons des lignées de souris déficientes pour les connexines majoritaires de l'oreille interne, *Cx26* et *Cx30*. Une dissection fine du rôle de ces connexines dans la cochlée est en cours. Afin d'obtenir une inactivation de *Cx26* et *Cx30* restreinte à certains types cellulaires, nous avons généré une nouvelle lignée de souris « floxées » au locus *Cx30*, ainsi que de nouvelles lignées transgéniques exprimant la recombinase Cre dans les cellules de soutien ou les fibrocytes cochléaires.

Par ailleurs, dans le but de comprendre comment se forment et se maintiennent les jonctions communicantes, des ligands des connexines 26 et 30 ont été recherchés par la technique de double-hybride dans la levure. L'un d'eux, nommé consortine en raison de son rôle probable dans l'adressage de connexines à la

membrane plasmique, est en cours d'étude. Nous avons montré par immunohistochimie dans les cellules NIH3T3 et HeLa, que la consortine endogène est associée au complexe golgien et aux vésicules de sécrétion. De plus, la consortine interagit directement avec certaines protéines du complexe golgien. Enfin, la production, par des cellules NIH3T3 (ou HeLa) co-transfectées, d'une consortine mutée et d'une connexine (Cx26, Cx30, ou Cx45), entraîne l'accumulation anormale de la connexine dans la voie de sécrétion, alors qu'une telle accumulation n'est pas observée dans des cellules témoins surexprimant une consortine non mutée. Ainsi, un défaut de l'interaction moléculaire entre consortine et connexine26 pourrait-il rendre compte des délocalisations cellulaires qui ont été mises en évidence pour certaines des connexines26 mutantes identifiées chez des individus atteints de surdité.

Les souris *Cx30*^{-/-} ont une surdité profonde, due en partie à l'absence de production du potentiel endocochléaire par la strie vasculaire. Au sein de la strie, la connexine30, comme la connexine26, est présente dans les cellules épithéliales basales et intermédiaires, mais pas dans les cellules marginales, ni semble-t-il dans les cellules endothéliales des capillaires intrastriaux. Chez ces souris, nous avons montré par une analyse morphologique approfondie de la strie vasculaire, couplée à des expériences de transfert de colorant, que les jonctions serrées situées entre les cellules endothéliales des capillaires de la strie vasculaire sont très anormales. Cette anomalie permet d'expliquer l'absence de potentiel endocochléaire chez le mutant *Cx30*^{-/-}, par une fuite de charges entre l'espace intrastrial et le compartiment sanguin, à travers ces « brèches » de l'endothélium. Les mécanismes impliqués dans cette rupture de la barrière endothéliale sont en cours d'étude. De plus, ce résultat inattendu invite à considérer la possibilité que l'atteinte du gène qui code pour la connexine26, à l'origine de la forme la plus fréquente de surdité (environ un enfant sur 2 000), provoque des anomalies similaires des capillaires de la strie vasculaire.

V. ÉPIDÉMIOLOGIE DES SURDITÉS HÉRÉDITAIRES PRÉLINGUALES

En partenariat avec un groupe de recherche de l'hôpital pédiatrique Armand Trousseau, membre de notre unité INSERM, nous poursuivons la caractérisation épidémiologique des surdités héréditaires et tentons d'apporter une description clinique fine de chacune des formes génétiques de surdité de l'enfant. L'étude porte actuellement sur plus de 1 000 familles. Nous nous sommes d'abord concentrés sur les formes génétiques les plus fréquentes, à savoir l'atteinte récessive des gènes *CX26* et *CX30*, qui codent respectivement la connexine26 et la connexine30, ainsi que celle du gène *PDS* qui code la pendrine.

PRINCIPALES PUBLICATIONS DU LABORATOIRE (2004-2005)

Adato A., Kikkawa Y., Reiners J., Alagramam K.N., Weil D., Yonekawa H., Wolfrum U., El-Amraoui A. & Petit C. (2005) Interactions in the network of Usher syndrome type 1 proteins. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 347-356.

Cohen-Salmon M., del Castillo F.J. & Petit C. (2005) Connexins responsible for hereditary deafness. The tale unfolds. *In* : Winterhager E. (ed.) *Gap Junctions in Development and Disease*. Heidelberg : Springer-Verlag, pp. 111-134.

del Castillo F.J., Rodríguez-Ballesteros M., Álvarez A., Hutchin T., Leonardi E., de Oliveira C.A., Azaiez H., Brownstein Z., Avenarius M.R., Marlin S., Pandya A., Shahin H., Siemering K.R., Weil D., Wuyts W., Aguirre L., Martín Y., Moreno-Pelayo M.A., Villamar M., Avraham K.B., Dahl H.-H.M., Kanaan M., Nance W.E., Petit C., Smith R.J.H., Van Camp G., Sartorato E.L., Murgia A., Moreno F. & del Castillo I. (2005) A novel deletion involving the connexin30 gene, del (*GJB6*-D13S1854), found in *trans* with mutations in the *GJB2* gene (connexin26) in subjects with DFNB1 nonsyndromic hearing impairment. *J. Med. Genet.*, 42, 588-594.

Delprat B., Michel V., Goodyear R., Yamasaki Y., Michalski N., El-Amraoui A., Perfettini I., Legrain P., Richardson G.P., Hardelin J.P. & Petit C. (2005) Myosin XVa and whirlin, two deafness gene products required for hair bundle growth, are located at the stereocilia tips and interact directly. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 401-410.

El-Amraoui A. & Petit C. (2005) The Usher I syndrome : a gene network underlying the cohesion of inner ear developing hair bundles. *J. Cell. Sci.* (in press).

Etournay R., El-Amraoui A., Bahloul A., Blanchard S., Roux I., Pezeron G., Michalski N., Daviet L., Hardelin J.P., Legrain P. & Petit C. (2005) PHR1, an integral membrane protein of the inner ear sensory cells, directly interacts with myosin 1c and myosin VIIa. *J. Cell. Sci.*, 13, 2891-2899.

Leibovici M., Verpy E., Goodyear R.J., Zwaenepoel I., Blanchard S., Lainé S., Richardson G.P. & Petit C. (2005) Initial characterization of kinocilin, a protein of the hair cell kinocilium. *Hear Res.*, 203, 144-153.

Marlin S., Feldmann D., Blons H., Loundon N., Rouillon I., Albert S., Chauvin P., Garabédian E.N., Couderc R. *et al.*, Petit C. & Denoyelle F. (2005) *GJB2* and *GJB6* mutations : genotypic and phenotypic correlation in a large cohort of hearing-impaired patients. *Arch. Otol. Head. Neck. Surg.*, 131, 481-487.

Michel V., Goodyear R.J., Weil D., Marcotti W., Perfettini I., Wolfrum U., Kros C., Richardson G.P. & Petit C. (2005) Cadherin 23 is a component of the transient lateral links in the developing hair bundles of cochlear sensory cells. *Dev. Biol.*, 280, 281-294.

Cohen-Salmon M., Maxeiner S., Krüger O., Theis M., Willecke K. & Petit C. (2004) Expression of the connexin43 — and connexin45 — encoding genes in the developing and mature mouse inner ear. *Cell. & Tissue Res.*, 316, 15-22.

Feldmann D., Denoyelle F., Chauvin P., Garabedian E.N., Couderc R. *et al.*, Petit C. & Marlin S. (2004) Large deletion of *GJB6* gene in deaf patients heterozygous for the *GJB2* gene mutation : genotypic and phenotypic analysis. *Am. J. Med. Genet.*, 127A, 263-267.

Feldmann D., Denoyelle F., Loundon N., Weil D., Garabedian E.N., Couderc R., Joannard A., Schmerber S., Delobel B., Leman J., Journal H., Catros H., Ferrec C., Drouin-Garraud V., Obstoy M.F., Moati L., Petit C. & Marlin S. (2004) Clinical evidence of the non-pathogenic nature of the M34T variant in the connexin26 gene. *Eur. J. Hum. Genet.*, 12, 279-284.

Modamio-Hoybjor S., Moreno-Pelayo M.A., Mencía A., del Castillo I., Charde-noux S., Morais D., Lathrop M., Petit C. & Moreno F. (2004) A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA50, maps to chromosome 7q32 between the DFNB17 and DFNB13 deafness loci. *J. Med. Genet.*, 41, e14.

Petit C. (2004) Memorial lecture — hereditary sensory defects : From genes to pathogenesis. *Am. J. Med. Genet.*, 130A, 3-7.

Ruf R.G., Xu P.X., Silvius D., Otto E.A., Beekmann F., Muerb U.T., Kumar S., Neuhaus T.J., Kemper M.J., Raymond R.M., Brophy P.D., Berkman J., Gattas M., Hyland V., Ruf E.M., Schwartz C., Chang E.H., Smith R.J.H., Strata-kis C.A., Weil D., Petit C. & Hildebrandt F. (2004) *SIX1* mutations cause bran-chio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 8090-8095.

Sousa S., Cabanes D., El-Amraoui A., Petit C., Lecuit M. & Cossart P. (2004) Unconventional myosin VIIa and vezatin, two proteins crucial for *Listeria* entry into epithelial cells. *J. Cell. Sci.*, 117, 2121-2130.

ENSEIGNEMENT

1. Enseignement au titre du Collège de France

1.a. Cours au Collège de France (6 heures) Les jeudis 3 février, 10 février, 17 février et 10 mars 2005

« Les synapses chimiques : physiologie et dynamique moléculaire »

1. Astrocytes et neurotransmission synaptique

Introduction

— Modèles d'étude de la glie

— La biologie des astrocytes jusqu'à la dernière décennie

Traitement par les astrocytes de l'information d'origine synaptique

Modulation de l'activité synaptique par les astrocytes

La D-sérine : un neuromodulateur glial ?

1.b. Cours à l'étranger :

- SFAX — **Tunisie** (2 heures)

2 mars 2005 – Invitants : Prs Hammadi AYADI, Directeur de l'Institut de Biotechnologie de Sfax & Adnen HAMMANI, Président de l'Université de Sfax

« **Physiologie et dynamique moléculaire des synapses chimiques : dialogue avec les astrocytes** »

- TUNIS — **Tunisie** (2 heures)

3 mars 2005 — Invitant : Pr Koussaï DELLAGI, Directeur de l'Institut Pasteur de Tunis

« **Physiologie et dynamique moléculaire des synapses chimiques : dialogue avec les astrocytes** »

1.c. Séminaires sous forme d'un symposium commun avec la chaire de « Communications Cellulaires » (Professeur Jean-Pierre Changeux)

Collège de France, 19 et 20 mai 2005 – Conférenciers et programme : voir le site de la chaire

« **Synapse formation and release of neurotransmitters/Les synapses : formation et libération des neurotransmetteurs** »

2. Enseignements autres

M2 Biologie Intégrative et Physiologie — Physiologie et physiopathologie neurosensorielle, 29 octobre 2004

« Transduction mécano-électrique dans les cellules sensorielles ciliées »

M2 Génétique Humaine et Neurobiologie (Erasmus), 29 novembre 2004, 23 février 2005

« Hereditary sensory defects »

3. Autres

EuroHear meeting EC Integrated project FP6 (responsable), Paris, mars 2005

PRINCIPAUX SÉMINAIRES ET CONFÉRENCES SUR INVITATION 2004-2005

Congrès de la Société de Biomécanique, Mécanotransduction, Créteil, septembre 2004

« **Transduction mécano-électrique auditive** »

Conference on The Molecular Biology of Hearing and Deafness, Bethesda, USA, septembre 2004

« Deciphering the molecular bases of the development and physiology of the hair bundle through deafness genes »

Journée de la Recherche, Institut Polytechnique Fédéral (EPFL), Lausanne, Suisse, novembre 2004

« Cochlear development and physiology : Insight into the underlying molecular mechanisms via deafness genes »

Annual Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology (ARO), New Orleans, USA, février 2005

« The USH1 gene network : molecular information underlying the cohesion of the growing hair bundle »

Deutsche Gesellschaft für Audiologie, Göttingen, Allemagne, février 2005

« Molecular genetics of hearing loss »

EU Genomed-Health, *Health of populations in the Mediterranean in the post-genomic era*, Institut PasteurTunis, mars 2005

« What have we learned from genome projects ? »

European GENetic DEAFness, *Genes, Hearing & Deafness, from molecular biology to clinical practice*, Caserta, Italie, mars 2005

Keynote lecture « Update on the Genetic Research »

International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Fluid Regulation, Los Angeles, USA, avril 2005

1. Introductory Lecture : « Ionic homeostasis of the inner ear and its dysfunctioning »

2. « Deafness due to connexin26 and/or connexin30 defects : from the genes towards to pathogenesis »

Tel Aviv University-Institut Pasteur meeting, *Neuroscience, Cells and Infection*, Tel Aviv, Israël, avril 2005

« Deciphering the molecular bases of the development and physiology of the hair bundle through deafness genes »

Neuroscience Graduate School, Johannes Gutenberg Universität Mainz, Allemagne, juillet 2005

« Deciphering the molecular bases of the development and physiology of the hair bundle through deafness genes »

PhD Seminar series, Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH), Universität, Allemagne, juillet 2005

« Human hereditary deafness : From genes to the molecular mechanisms underlying the development and the physiology of the auditory hair cells »