

Génétique et physiologie cellulaire

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

MÉCANISMES D'ANALYSE DES FRÉQUENCES SONORES

Les cours ont été consacrés à l'analyse fréquentielle effectuée par la cochlée, organe sensoriel auditif des mammifères, les structures impliquées et leur mode de fonctionnement, ainsi qu'à la sensibilité de la réponse cochléaire. Les cours ont également traité certains aspects de la distorsion des sons reçus par la cochlée.

Chez l'adulte jeune, la discrimination fréquentielle cochléaire est telle qu'il peut distinguer un changement fréquentiel de 1/1 000 pour des fréquences de l'ordre de 1 000 Hz. La sensibilité de la cochlée est extrême puisqu'aux fréquences sonores proches de 1 000 Hz, l'énergie acoustique minimale décelée par la cochlée est voisine de celle du bruit thermique.

Depuis longtemps, ces propriétés ont suscité les interrogations des physiciens et des physiologistes. Dès 1843, Georg Simon Ohm émettait l'hypothèse selon laquelle l'oreille fonctionne selon le principe représenté par les séries de Joseph Fourier, c'est-à-dire qu'elle effectue un travail d'analyse spectrale en décomposant les spectres sonores complexes en leurs composants élémentaires (sons purs). En 1863, Hermann von Helmholtz proposa la résonance comme principe de fonctionnement de la cochlée pour rendre compte de l'analyse fréquentielle et de la sensibilité de l'oreille interne ; la cochlée, pensait-il, abrite une série de résonateurs indépendants accordés à des fréquences distinctes. Enfin, en 1948, l'astrophysicien Thomas Gold postula l'existence de mécanismes actifs dans la cochlée, pour expliquer la très grande sensibilité de cet organe alors même que la stimulation mécanique des cellules sensorielles est soumise à un amortissement en raison de leur immersion dans les fluides cochléaires. De fait, dans tous les organes auditifs des vertébrés, des phénomènes actifs existent, qui se traduisent par l'émission spontanée de sons par l'organe lui-même (otoémissions acoustiques), même en l'absence de stimulation sonore.

Les travaux des quatre dernières décennies, effectués dans diverses espèces, ont révélé un ensemble de structures des organes sensoriels auditifs, cellules et matrices extracellulaires, qui, par leurs propriétés biophysiques et/ou électriques, sous-tendent la sélectivité fréquentielle et la sensibilité de la cochlée. La membrane basilaire sur laquelle repose le neuroépithélium auditif, la membrane tectoriale qui le recouvre et les cellules sensorielles elles-mêmes, par leur résonance électrique et/ou l'oscillation mécanique spontanée active de leur touffe ciliaire, jouent un rôle essentiel dans l'analyse spectrale. Chez les mammifères, la sensibilité de la perception auditive implique un mécanisme particulier d'amplification de la stimulation incidente, l'électromotilité des parois des cellules ciliées externes (voir résumé du cours 2002-2003). Ces différents procédés d'analyse spectrale du son par l'oreille ont été abordés lors du cours, à l'exception de la motilité active de la touffe ciliaire, principalement discutée dans le cadre des séminaires. Les séminaires en rapport avec le cours ont aussi apporté une perspective évolutive sur certains points du cours et ont donné l'occasion de discuter de résultats non publiés.

En conclusion, des incertitudes demeurent sur la participation d'autres mécanismes à la discrimination fréquentielle et la sensibilité de la cochlée. Depuis que l'organe de l'audition est devenu indépendant du vestibule (chez les tétrapodes), les cellules sensorielles ont une architecture qui varie strictement en fonction de la fréquence caractéristique de leur réponse. Dans la cochlée des mammifères, l'existence d'un rôle important de la touffe ciliaire dans l'analyse fréquentielle *via* son oscillation spontanée (s'ajoutant à sa résonance passive) demeure une interrogation majeure (de telles oscillations spontanées n'ont à ce jour été observées que chez la tortue et la grenouille, espèces chez lesquelles la fréquence de ces oscillations varie d'une cellule à l'autre en fonction de la fréquence caractéristique de la cellule (voir plus loin)). La fonction de la membrane tectoriale, membrane acellulaire qui recouvre l'épithélium sensoriel, avait jusqu'à présent été modélisée sans réel support expérimental, en dehors de quelques analyses de son mouvement induit par la stimulation sonore. La génétique, par l'identification des protéines qui composent la membrane tectoriale et la possibilité de les modifier à volonté, ouvre maintenant la voie à une bien meilleure compréhension du rôle de cette membrane. Quant aux mécanismes moléculaires qui sous-tendent les propriétés discutées, leur décryptage débute tout juste, avec deux avancées significatives, la découverte des bases moléculaires de la résonance électrique des cellules sensorielles, et celle d'une protéine impliquée dans l'électromotilité des cellules ciliées externes des mammifères, la prestine.

La membrane basilaire : un analyseur fréquentiel

La membrane basilaire est composée d'une matrice extracellulaire, de fibrilles et de cellules mésothéliales dispersées. Elle s'étend de l'axe spiral osseux, creux

et central de la cochlée, le modiolus, au ligament spiral, sur toute la longueur de l'organe. Elle comporte deux régions. L'une, centrale dite zone arquée (*zona arcuata*), insérée sur le modiolus, s'étend jusque sous les cellules piliers externes et est parcourue de fibres longitudinales ; elle est rigide et donc peu mobile. L'autre dite zone pectinée (*zona pectinata*) s'étend des cellules piliers externes jusqu'au ligament spiral ; elle est parcourue de fibrilles de direction radiale (perpendiculaires aux premières) qui s'étendent jusqu'au ligament spiral. Contrairement à la zone arquée, la zone pectinée de la membrane basilaire est très mobile.

C'est en étudiant des spécimens d'oreilles de cadavres humains et de cobayes que le hongrois Georg von Békésy observa qu'une stimulation électromécanique de l'étrier (dernier osselet de l'oreille moyenne) mimant celle de la stimulation sonore induisait la vibration de la membrane basilaire. En pratiquant une ouverture dans la cochlée, en y introduisant l'objectif à immersion d'un microscope, il analysa le mouvement de la membrane basilaire en suivant, sous illumination stroboscopique, celui de cristaux d'argent déposés sur le neuroépithélium. Il conclut à l'existence d'une onde propagée par la membrane basilaire de la base à l'apex de la cochlée, et dont l'amplitude va croissant et la vitesse décroissant au fur et à mesure de sa progression, jusqu'à un point où l'onde « s'effondre » brusquement (« région de rupture de la vague »). Il observa que pour les fréquences incidentes élevées, l'amplitude maximale du déplacement (et donc la « rupture de la vague ») se situe à la base de la cochlée, tandis que pour les fréquences basses, l'onde voyage jusqu'à l'apex et atteint son maximum dans cette région. La localisation du déplacement maximal de la membrane basilaire est dépendante de la fréquence du son incident. Ainsi, la membrane basilaire se comporte comme un analyseur fréquentiel : à chacun des composants fréquentiels d'un son incident, correspond un point donné sur l'axe longitudinal de la membrane basilaire où se produit un déplacement maximal de la membrane. Cette « conversion fréquence/position » par la cochlée a reçu le nom de transformation tonotopique ou tonotopie. Puis, Georg von Békésy utilisera comme modèle de la membrane basilaire une membrane artificielle déformable, et soulignera le rôle de sa rigidité dans l'analyse fréquentielle. De fait, la rigidité de la membrane basilaire décroît de la base à l'apex de la cochlée (d'un facteur estimé de 100 à 10 000 entre ses deux extrémités, selon les auteurs). En 1961, Georg von Békésy reçut le Prix Nobel pour cette découverte. Aujourd'hui, d'autres interprétations des mécanismes mis en jeu dans cette analyse fréquentielle opérée par la membrane basilaire sont proposées, dans lesquelles la résonance de la membrane basilaire est prise en compte. L'énergie acoustique serait transférée à la membrane basilaire qui subirait un mouvement résonant. Les principes du fonctionnement de la membrane basilaire comme analyseur fréquentiel sont encore débattus, d'autant plus que les observations de son déplacement à l'apex de la cochlée demeurent techniquement difficiles.

Les mouvements de la membrane basilaire sur cochlée *ex vivo* entraînent des « pics » de déformation relativement larges, d'où le problème, qui a été rapide-

ment soulevé, de l'exacte contribution de la membrane basilaire à la sélectivité fréquentielle. En réalité, dès 1954, I. Tasaki avait procédé à des enregistrements *in vivo* des neurones auditifs qui montraient, en accord avec les données psycho-acoustiques, leur haute sélectivité fréquentielle. Les courbes d'accord en fréquence des neurones auditifs (seuil de réponse, en dB, en fonction de la fréquence du son incident), qui reflètent la totalité du filtrage du son jusqu'à l'étape finale (c'est-à-dire la création d'un potentiel d'action sur le nerf auditif), sont en effet remarquablement « étroites », contrairement aux déplacements de la membrane basilaire susmentionnés.

La compréhension du rôle de la membrane basilaire dans la sélectivité fréquentielle de la réponse cochléaire a grandement progressé lorsque des techniques utilisant l'effet Mössbauer et l'interférométrie laser ont permis de procéder à des analyses de ces déplacements *in vivo*. Des déplacements de 0.1 nm au seuil de réponse sont observés (pour des mouvements de la membrane tympanique dont l'amplitude est de 0.01 nm). Des enregistrements de la réponse de la membrane basilaire à différentes fréquences ont été effectués en différents points le long de son axe longitudinal, points pour lesquels la fréquence caractéristique (FC) des fibres nerveuses innervant les cellules sensorielles situées immédiatement en regard avait été établie. La dynamique de la membrane basilaire s'est alors révélée très différente de celle observée auparavant, tant en ce qui concerne le seuil de la réponse que la pente du pic de la réponse (déplacement de la membrane basilaire/intensité sonore). L'intensité sonore minimale qui crée un déplacement de la membrane basilaire est observée pour un son de fréquence identique à la FC des fibres nerveuses innervant les cellules sensorielles situées à l'emplacement de la membrane basilaire que l'on étudie : un déplacement de 0.3 nm de la membrane basilaire est observé pour un son de 1 dB à ce point de FC (FCempl), tandis qu'à distance de ce point, un déplacement ne sera décelé que pour des intensités de 40 à 60 dB. Quelle que soit l'intensité du son incident, le déplacement de la membrane basilaire est maximal au FCempl. Alors que le déplacement de la membrane basilaire par dB, à distance de FCempl, est constant quelle que soit l'intensité sonore, à l'inverse, au FCempl, il varie considérablement avec l'intensité sonore. Jusqu'à 20-30 dB, au FCempl, la relation déplacement de la membrane basilaire par dB en fonction de l'intensité sonore exprimée en dB est linéaire, avec une valeur de pente légèrement plus faible qu'à distance du FCempl (0.8 *versus* 1). Le rapport du déplacement de la membrane basilaire par dB au FCempl et à distance peut atteindre une valeur de 500, voire plus pour certains auteurs. Au-delà de 60 dB, au contraire, le déplacement de la membrane basilaire par dB, devient plus faible au FCempl qu'à distance (pente d'environ 0.3 *versus* 1) ; il y a « compression » de la réponse. Au FCempl, le rapport des valeurs du déplacement de la membrane basilaire par dB, entre 20 et 30 dB d'une part, et entre 90 et 100 dB d'autre part, est de l'ordre de 2 000. Aussi la courbe d'accord en fréquence du déplacement de la membrane basilaire à un emplacement donné comporte un pic, centré sur la FC, dont l'étroitesse est

comparable à celle du pic de la courbe d'accord en fréquence de la réponse des neurones auditifs à ce même emplacement. La non-linéarité de la réponse disparaît lorsque la cochlée est dévitalisée, d'où l'hypothèse selon laquelle la cochlée abrite un amplificateur de la stimulation mécanique de la membrane basilaire, qui met en jeu des processus actifs. Disparaît aussi, dans la cochlée dévitalisée, une autre propriété de la réponse à la fréquence caractéristique : à la FC, l'onde qui parcourt la membrane basilaire (analysée sous les cellules ciliées externes) présente un décalage de phase de 180° par rapport à l'onde sonore qui frappe le tympan ; cette valeur est constante quelle que soit l'intensité sonore. En revanche, pour les fréquences voisines de la FC, le décalage de phase varie avec l'intensité sonore : le sens de la variation (avance ou retard) s'inverse pour les fréquences immédiatement inférieures et immédiatement supérieures à la FC.

La composante radiale du mouvement de la membrane basilaire induit par la stimulation acoustique n'a véritablement commencé à être analysée qu'en 1999. Dans le sens radial, à la FC, on observe deux points de déplacement maximum de la membrane basilaire, l'un entre les pieds des cellules piliers internes et externes (qui comme leur nom l'indique, sont des cellules particulièrement rigides), et l'autre immédiatement au-dessous des cellules ciliées externes. Entre ces deux points, la phase de l'onde qui parcourt la membrane basilaire présente un décalage constant de 135° . Le point de déplacement minimal de la membrane basilaire se situe sous les cellules piliers externes. Comme dans le sens longitudinal, dans le sens radial, les décalages de phases entre le déplacement de la membrane basilaire et l'onde sonore qui fait vibrer le tympan, ne varient pas avec l'intensité sonore au FCempl, alors qu'ils se modifient pour les fréquences voisines de la fréquence caractéristique. Ces caractéristiques du mouvement de la membrane basilaire dans le sens radial, au FCempl, disparaissent dans la cochlée dévitalisée.

La cochlée, siège d'une amplification non linéaire de l'onde mécanique incidente, distord fortement le message sonore. Ainsi, le violoniste italien Guiseppè Tartini a revendiqué la découverte de la perception de sons additionnels lorsque 2 sons, dont le rapport des fréquences est de 1.2 à 1.25, sont présentés simultanément à un auditeur. Ces sons additionnels, dits « produits de distorsion », composés par la cochlée elle-même, correspondent à l'addition ou la soustraction des fréquences des harmoniques de chacun des sons incidents. Enfin, la réponse de la cochlée au FCempl perd ses propriétés lorsqu'un son est présenté simultanément avec un deuxième son de fréquence éloignée (phénomène de suppression). Produits de distorsion et phénomène de suppression sonore nécessitent eux aussi la présence de mécanismes cochléaires actifs.

La cellule ciliée externe, un amplificateur cochléaire aux propriétés piézoélectriques : implication de la prestine

En 1978, David Kemp rapporte l'existence, chez l'homme, de sons émis par l'oreille, ou « otoémissions acoustiques ». Ces sons peuvent être enregistrés dans

une ambiance silencieuse en plaçant un microphone dans le conduit auditif externe. Depuis, des otoémissions acoustiques ont été décelées chez tous les tétrapodes. Les otoémissions acoustiques peuvent être spontanées, ou provoquées par des stimulations sonores de faible intensité. Dans ce cas, on peut également enregistrer l'émission de produits de distorsion acoustique (lorsqu'on stimule avec 2 sons simultanés). David Kemp interpréta d'emblée les otoémissions acoustiques comme la traduction d'une énergie produite dans la cochlée, en accord avec la proposition de Thomas Gold. Les otoémissions acoustiques sont labiles, disparaissent en *post-mortem*. Les otoémissions spontanées sont continues, alors que provoquées, elles durent environ 20 ms après l'arrêt de la stimulation sonore. Elles sont inhibées par la prise de fortes doses d'acide acétylsalicylique, 10 g/jour, qui conduit à une perte auditive d'environ 40 dB. À l'arrêt de la prise médicamenteuse, les otoémissions réapparaissent et l'acuité auditive est restaurée. Elles sont modulées par le système efférent médian. L'enregistrement des otoémissions acoustiques est très utilisé en pratique médicale car la méthode est non-invasive. Elle permet notamment chez un nourrisson de suspecter une surdité (en l'absence d'otoémissions acoustiques), et chez un adulte atteint de surdité neurosensorielle avérée, d'en évoquer l'origine rétrocochléaire (si des otoémissions acoustiques sont décelées).

Cinq ans plus tard, en 1983, William Brownell découvrait la contractilité de la paroi des cellules ciliées externes (CCE). Cette découverte faisait suite à l'observation faite en 1967, par A.J. Goldstein et O. Mizukoshi, d'un changement de la forme des CCE lorsqu'elles sont placées dans un milieu riche en K^+ . Brownell démontra que la dépolarisation des CCE entraîne une diminution de la longueur de leur corps cellulaire et une augmentation de leur largeur, et que l'hyperpolarisation a l'effet inverse, d'où le terme d'électromotilité. Il proposa que le changement de la longueur des CCE module la distance entre la membrane basilaire et la lame réticulaire (formée par les surfaces apicales des cellules du neuroépithélium auditif) et modifie la rigidité de l'organe de Corti. Plus tard, ces cycles de contraction-décontraction de la CCE, rythmés par les cycles de sa dépolarisation-repolarisation, furent considérés comme susceptibles d'accroître les déplacements de la membrane basilaire s'ils survenaient à l'emplacement et au moment appropriés par rapport au déplacement passif de cette dernière. En effet, la touffe ciliaire des CCE, stimulée par un faible déplacement de la membrane basilaire, oscille au rythme du son. En augmentant le déplacement de la membrane basilaire, les CCE augmenteraient l'amplitude du déplacement de leur touffe ciliaire et donc l'intensité du courant entrant (rétro-contrôle positif). William Brownell vit dans ces changements de longueur des CCE, la source énergétique recherchée dans la cochlée pour expliquer les propriétés de la membrane basilaire, observées exclusivement *in vivo*, au FCempl. L'énergie délivrée par la motilité des CCE pouvait contrebalancer les effets d'amortissement dus aux milieux liquidiens cochléaires. Ultérieurement, il proposa aussi que l'électromotilité soit à l'origine des otoémissions acoustiques.

Des enregistrements *in vivo* ont démontré que les CCE se raccourcissent et s'allongent au moment où la vitesse de déplacement de la membrane basilaire est maximale, respectivement vers le « haut » (vers la *scala media*) et vers le « bas » (vers la *scala tympani*). Ce moment est celui où, dans son mouvement, la membrane basilaire croise sa ligne de base (les forces de friction, alors maximales, seraient antagonisées par les forces dues à l'électromotilité des CCE). Il a aussi été décrit que le système efférent médian régule l'amplitude des déplacements de la membrane basilaire *in vivo*, au FCempl.

Ce changement de forme de la CCE n'est pas confiné en un point particulier de la membrane plasmique, mais concerne presque toute la hauteur du corps cellulaire, de la région supra-nucléaire à celle de la plaque cuticulaire (réseau de filaments d'actine horizontaux situé à l'apex du corps cellulaire, sous la touffe ciliaire, et dans lequel les racines des filaments d'actine des stéréocils sont enchâssés, voir cours 2002-2003). Pour une CCE qui répond aux hautes fréquences sonores (sons aigus), le changement de taille est de l'ordre de 1 μm pour une hauteur du corps cellulaire de 20 μm , et pour une CCE qui répond aux basses fréquences (sons graves), il est de 5 μm pour une hauteur de 100 μm , soit une variation constante de 5 % de la longueur du corps cellulaire. Lorsque la CCE est soumise à un courant alternatif, les parois latérales se contractent cycle par cycle jusqu'aux fréquences testées les plus élevées, environ 70 kHz. Ces contractions sont indépendantes de l'ATP et du Ca^{2+} , indiquant que leur origine se situe sans doute au niveau de la membrane plasmique elle-même et non du cytosquelette sous-cortical. En revanche, ces contractions sont dépendantes du potentiel endocochléaire, qui lui-même conditionne la transduction mécano-électrique auditive. Elles sont inhibées par l'acide acétylsalicylique. Elles sont modulées par l'acétylcholine, médiateur du système efférent médian qui innerve les CCE. Jonathan Ashmore, et plus formellement, Joseph Santos-Sacchi ont montré qu'elles sont dépendantes du potentiel électrique de la membrane et non du courant qui la traverse. Dans les CCE, contrairement à ce qui est observé dans la plupart des autres cellules, la capacité membranaire (C_m) (qui représente les mouvements de charge en fonction du voltage) varie en fonction du potentiel de membrane. Elle est maximale au potentiel de repos (c'est-à-dire que le transfert maximal de charges a lieu au potentiel de repos), et décroît quand on s'éloigne du potentiel de repos. Ce mouvement de charges transitoire, de faible intensité et dépendant du potentiel de membrane, évoque le « courant de porte » (*gating current*) des canaux ioniques dépendants du voltage, dû au déplacement de la boucle S4 composée d'acides aminés chargés sous l'effet du changement du potentiel de membrane. Enfin, l'application, sur les CCE, de forces mécaniques qui modifient leur longueur, entraîne des variations de leur potentiel de membrane. Par conséquent, la membrane des CCE a un comportement semblable à celui d'un composé piézoélectrique.

La paroi latérale des CCE a une organisation tout à fait particulière. Elle se caractérise par la présence, sous la membrane plasmique, d'un ensemble de

membranes qui forment des citernes latérales. Ces citernes sont de grandes vésicules plates qui renferment un matériel acellulaire. La membrane plasmique et la couche la plus externe des citernes sont séparées par un espace d'environ 30 nm, l'espace extra-cisternal. Ces citernes ne sont caractérisées par aucun marqueur spécifique, mais paraissent s'apparenter au réticulum canaliculaire, structure que l'on trouve sélectivement dans les épithéliums qui assurent le transport des ions. La membrane de ces citernes contiendrait moins de cholestérol que les membranes plasmiques apicale et basale. Dans l'espace extra-cisternal se localisent les protéines du cytosquelette, qui confèrent à la CCE sa forme cylindrique. Elles forment une sorte de treillis très organisé, composé de filaments d'actine distants de 30 à 80 nm et solidarisés par de la spectrine. Dans le plan perpendiculaire à ce treillis, des piliers de 25 nm de long et 10 nm de diamètre s'étendent jusqu'à la membrane plasmique. Ce treillis cortical est organisé en microdomaines, définis par l'orientation uniforme de leurs filaments d'actine. L'orientation des filaments d'actine diffère d'un microdomaine à l'autre, mais au total les microdomaines reconstituent une orientation circonférencielle des filaments d'actine. Les « filaments » de spectrine, qui contrairement aux filaments d'actine ne sont pas rigides, sont orientés dans la direction de l'axe longitudinal du corps cellulaire, c'est-à-dire l'axe de contraction de la cellule. Les analyses en cryofracture de la face interne de la membrane plasmique des CCE ont révélé un ensemble de particules de 8 à 15 nm de diamètre, ordonnées et de densité très élevée (de 2 500 à 3 000 particules/ μm^2), formant un ensemble très organisé. Ces particules, tout comme les citernes latérales et le cytosquelette hautement architecturé qui leur est associé, ne sont pas présentes dans les cellules ciliées internes (CCI), les véritables cellules sensorielles auditives puisque responsables de la quasi-totalité des signaux électriques cochléaires qui sont transmis au système nerveux central.

En se fondant sur le fait que CCE et CCI diffèrent peu, si ce n'est par la présence ou l'absence d'électromotilité, les composants moléculaires impliqués dans cette fonction ont été recherchés par hybridation soustractive d'ADN complémentaire dérivé de ces cellules, prélevées une à une. Cette approche a conduit en l'an 2000 à l'isolement d'un ARNm qui code une protéine de 744 acides aminés dont le poids moléculaire attendu est de 80 kDa. Elle comporte 12 segments hydrophobes, dont les prédictions de structure indiquent qu'il s'agit sans doute de segments transmembranaires. Sa séquence primaire l'apparente à un transporteur d'anions, la pendrine (protéine défectueuse dans le syndrome de Pendred), découvert quelques années auparavant. Elle est en effet, comme la pendrine, l'un des membres de la famille de protéines SLC26 (pour *solute carrier*). Cette protéine, SLC26A5, a été nommée prestine. Exprimée dans des cellules eucaryotes transfectées, la prestine se localise à leur membrane plasmique et leur confère un ensemble de propriétés : (1) une motilité de leur membrane plasmique dépendante de V_m (potentiel de membrane), qui disparaît en présence d'acide acétylsalicylique, (2) une variation de leur capacité membranaire C_m en

fonction du voltage imposé, qui ressemble à celle des CCE (C_m maximale), (3) enfin, soumises à un étirement mécanique, leur potentiel de membrane se modifie, indiquant que l'application d'une force mécanique affecte les propriétés électriques de la membrane. De plus, l'expression de la prestine débute au jour postnatal 6 chez la souris : son expression précède donc de peu l'apparition de l'électromotilité. L'inactivation, par recombinaison homologue chez la souris, du gène qui code la prestine a été réalisée. En accord avec une implication proposée dans l'amplificateur cochléaire des CCE et le fait que seules les CCI ont une fonction proprement sensorielle, les souris dont les deux allèles de ce gène sont délétés, ont une perte de l'acuité auditive de 40 à 60 dB et non une surdité totale. Les souris hétérozygotes, qui expriment sans doute la moitié de la quantité normale de prestine, ont une perte auditive de 6 dB, qui correspond à un doublement du seuil de pression sonore perçu normalement. La perte auditive est plus élevée aux hautes fréquences, pour lesquelles le rôle de l'amplification par les CCE est lui aussi plus important. Ces résultats constituent de solides arguments en faveur du rôle de la prestine dans l'électromotilité. Reste à comprendre son mode d'action. Dans un premier temps, l'analogie avec les canaux ioniques dépendants du voltage laissait penser que la prestine elle-même était sans doute le détecteur du voltage qui, sous l'effet des variations du potentiel de membrane, changeait de conformation. Une expérience très directe a permis de prouver que tel n'est pas le cas. Le remplacement un à un, par un acide aminé non chargé, de chacun des acides aminés chargés de la prestine non présents à la même position chez les autres membres de la famille SLC26 qui sont dépourvus de propriétés contractiles, ne fait pas disparaître les propriétés piézoélectriques de la prestine. D'où l'idée que ce sont des charges extrinsèques à la prestine qui agissent comme « détecteur » du voltage. Il a été démontré que le Cl^- intracellulaire joue ce rôle ; lorsque la concentration de cet ion est abaissée de 150 mM à 2 mM, dans des cellules transfectées synthétisant la prestine, la contraction de ces cellules lors d'une dépolarisation est presque totalement abolie. Sous l'effet du changement de voltage, le Cl^- serait transloqué à la membrane et, sous l'action conjuguée du voltage et de la fixation du Cl^- , la conformation de la prestine serait modifiée. Quant à l'acide acétylsalicylique, il serait un antagoniste compétitif du Cl^- , inhibant sa fixation à la prestine en un ou plusieurs sites non encore caractérisés.

Au-delà de la dissection en termes moléculaires du mode d'action de la prestine, encore inachevée (mode d'action du Cl^- , rôle du cytosquelette sous-cortical...), la question demeure de la réalité de la contraction à haute fréquence des parois des CCE en contexte physiologique ; le cycle polarisation-dépolarisation créé par le mouvement de la touffe ciliaire induit par le son fait en effet intervenir la constante de temps électrique de la membrane plasmique, dont la valeur est difficilement conciliable avec des fréquences de contraction allant jusqu'à 20 kHz chez l'homme et 150 kHz chez certaines chauve-souris.

La membrane tectoriale

La membrane tectoriale est un gel acellulaire qui couvre l'épithélium sensoriel. Elle s'ancre dans sa partie interne, et sur toute la longueur de la cochlée, au-dessus du limbe spiral (au niveau des cellules interdentes), lui-même solidaire du modiolus. Elle s'étend, dans le sens radial, jusqu'aux cellules de Hensen (cellules de soutien immédiatement externes à la dernière rangée des cellules de Deiters qui encorbellement les CCE). Son ancrage radial varie considérablement au cours du développement. Chez la souris, la membrane tectoriale est d'abord attachée aux stéréocils des cellules ciliées internes (CCI) et des CCE ; son attachement aux CCI disparaît au 10^e jour après la naissance. Toutefois, l'absence d'ancrage des CCI à la membrane tectoriale n'est, semble-t-il, pas généralisable à l'ensemble des mammifères, ou même à toute la cochlée dans une espèce donnée. En effet, l'analyse des indentations qu'impriment les stéréocils dans la membrane tectoriale indique que cette membrane serait solidaire des stéréocils des CCI de la base de la cochlée (répondant aux hautes fréquences) chez le rat (peut-être aussi chez l'homme), et de l'ensemble des CCI chez les chauves-souris. Chez l'adulte, la membrane tectoriale demeure attachée aux touffes ciliaires de l'ensemble des CCE (sauf à l'extrême apex de la cochlée), mais seule la rangée la plus haute (i.e. la plus externe) des stéréocils établit ce contact. Durant le développement, la membrane tectoriale est aussi associée, *via* un réseau de matrice extracellulaire, à la surface apicale des cellules de Deiters et des cellules de Hensen. Chez l'adulte, il persiste un ancrage du bord « libre » (externe) de la membrane tectoriale aux cellules de Hensen par le « réseau marginal » (*marginal net*), ainsi qu'un autre ancrage de sa partie médiane, par la « bande de Hensen » (*Hensen stripe*), à la cellule de soutien immédiatement interne à la CCI, la « cellule bordante » (*border cell*). Les touffes ciliaires des cellules sensorielles lient donc mécaniquement la membrane tectoriale à la membrane basilaire, soit par leur contact direct avec la membrane tectoriale, soit par leur couplage visqueux *via* le fluide sous-tectorial.

La membrane tectoriale est un gel de composition non homogène, dans son sens transversal (épaisseur), son sens radial (où l'on distingue 3 zones) et longitudinal (où elle serait plus rigide à la base qu'à l'apex). Son impédance mesurée chez les mammifères est supérieure (3,4 fois) dans le sens radial (direction de son mouvement) par rapport au sens longitudinal, et supérieure (2,4 fois) dans le sens radial par rapport au sens transversal. Les changements ioniques entraînent une réponse osmotique de cette membrane qui affecte principalement sa dimension transversale et, dans une moindre mesure, sa dimension radiale. La membrane tectoriale est donc un gel polyélectrolytique, dont les propriétés chimiques, électriques et mécaniques sont liées. Elle est parcourue de fibrilles d'orientations différentes mais principalement radiales, constituées de collagènes (collagène II, IX, V ou XI), qui contribuent sans doute à sa rigidité (ces fibrilles sont absentes chez le poulet, qui répond à des fréquences sonores plus basses que les mammifères). Ces fibrilles sont concentrées dans sa zone médiane, c'est-à-dire au-dessus

des CCI et CCE. La membrane tectoriale contient d'autres glycoprotéines et des protéoglycanes ; la répartition de ces composants varie dans les 3 dimensions de la membrane. Ils sont synthétisés par les cellules du limbe spiral et les cellules de soutien de l'épithélium sensoriel. Leur taux de renouvellement chez l'adulte n'a pas été évalué, mais des données d'immunohistochimie suggèrent qu'il est faible. Trois glycoprotéines de la membrane tectoriale ont été identifiées : l' α -tectorine, la β -tectorine, et l'otogéline. L' α -tectorine est une volumineuse protéine modulaire (2 150 aa pour l'une des isoformes chez le poulet) composée d'un domaine N-terminal semblable au 1^{er} domaine globulaire de l'entactine (un composant des membranes basales), d'une région centrale faite de 3 domaines WF (pour *von Willebrand Factor*) de type D complets et de 2 incomplets ; elle se termine par un domaine C-terminal de type ZP indiquant son homologie avec une protéine de la zone pellucide qui couvre l'œuf. La β -tectorine (320 aa chez le poulet) ne comporte qu'un seul domaine identifiable, un domaine ZP en C-terminal. Quant à l'otogéline, volumineuse protéine modulaire (2 887 aa chez la souris), elle comporte une région centrale riche en thréonine-sérine-proline (TSP), précédée de 4 domaines WF de type D en N-terminal et suivie d'un autre domaine WF de type D puis de 5 domaines WF de type B ; elle se termine par une région similaire à celle d'autres protéines comportant des répétitions de type WF, telles que les mucines.

La résonance de la membrane tectoriale pour une fréquence incidente donnée se situe à un emplacement qui correspond à une demi-octave au-dessous de celui de la membrane basilaire défini plus haut comme FCempl. La question de la contribution de la membrane tectoriale aux propriétés particulières de la réponse de la membrane basilaire à la fréquence caractéristique, qui n'avait pu être abordée expérimentalement, l'a été très récemment grâce à l'inactivation du gène qui code pour l' α -tectorine chez la souris. En effet, chez les souris α -*tecta*^{-/-}, homozygotes pour la délétion du gène *Tecta*, la membrane tectoriale perd toute attache avec le neuroépithélium sous-jacent, supprimant tout rôle de cette membrane dans la réponse auditive. L'étude de ces animaux mutants a permis de conclure que le couplage de la membrane tectoriale à la membrane basilaire n'était pas impliqué dans la sélectivité fréquentielle de la réponse de la membrane basilaire, mais l'était dans la sensibilité de sa réponse (élévation du seuil de réponse d'environ 30 dB chez les animaux mutants). L'ensemble des résultats démontre que la membrane tectoriale joue un rôle dans l'amplification du déplacement de la membrane basilaire. De plus, un second pic de déplacement de la membrane basilaire, situé à une demi-octave au-dessous de la FC, a été observé chez les souris sauvages à l'occasion de cette étude ; ce pic « secondaire » est absent chez les souris mutantes. Ceci indique qu'à la FC de la réponse de la membrane basilaire, la membrane tectoriale agit vraisemblablement comme une masse inertielle et non *via* sa résonance. Par ailleurs, l'enregistrement des potentiels extracellulaires dynamiques (potentiels microphoniques, essentiellement dus à l'activité des CCE) chez les souris α -*tecta*^{-/-} montre qu'ils sont asymétriques

quelle que soit l'intensité du son incident et pas seulement aux intensités élevées comme normalement. Ceci permet de conclure que la membrane tectoriale a pour rôle de maintenir la touffe ciliaire des CCE dans une position où, au repos, 50 % de ses canaux de mécanotransduction sont ouverts et l'efficacité de la transduction mécano-électrique est maximale (cf. courbe variation du potentiel de membrane/déplacement de la touffe ciliaire).

La rigidité de la membrane tectoriale est de l'ordre de $200 \cdot 10^{-3}$ N/m. Elle serait du même ordre que celle de la membrane basilaire à un emplacement tonotopique donné (seules les régions cochléaires apicales ont été étudiées). Comme celle de la membrane basilaire, elle décroît de la base à l'apex. Il manque pour interpréter le rôle de la membrane tectoriale, une connaissance de la rigidité de la touffe ciliaire et de ses variations en fonction de la fréquence caractéristique de la cellule. Les estimations de cette rigidité, aujourd'hui variables, indiquent qu'elle serait de l'ordre de $2 \cdot 10^{-3}$ N/m. Compte tenu du fait que la membrane tectoriale agit comme un corps rigide sur une distance d'environ 20 μm , qui couvre 6 à 9 CCE, et dont la rigidité totale serait donc d'environ $15 \cdot 10^{-3}$ N/m, ceci suggère que la rigidité de la membrane tectoriale est environ 10 fois supérieure à celle des touffes ciliaires dont elle est solidaire. Pour évaluer à la fois la charge mécanique que transfèrent les cellules ciliées à la membrane basilaire, et celle que la membrane basilaire transfère aux touffes ciliaires, il faudrait connaître l'impédance mécanique de chacune des structures impliquées, et aux diverses fréquences audibles. Bien des inconnues persistent donc sur la dynamique du couplage entre la membrane tectoriale et la touffe ciliaire.

La résonance électrique : une gamme de canaux K^+ dépendant du voltage et régulés par le Ca^{2+}

En 1981, Robert Fettiplace et Andrew Crawford observent que l'injection d'un courant (20 pA pendant 50 ms) dans une cellule sensorielle auditive de la papille basilaire de tortue engendre, à l'installation et à l'arrêt du courant, une oscillation de V_m qui s'amortit progressivement. L'analogie de comportement de ces cellules avec celui des circuits électriques oscillants (circuit RLC = résistance-auto-inductance-capacité), d'emblée soulignée par ces chercheurs, servira de fil conducteur pour en comprendre l'origine. Robert Fettiplace montrera ensuite que la fréquence de ces oscillations électriques est différente d'une cellule à l'autre, mais semblable pour chaque cellule à sa fréquence caractéristique (FC) acoustique (fréquence de la stimulation sonore pour laquelle le seuil de réponse est le plus bas). Ces oscillations sont donc conformes à la tonotopie de l'organe et établissent un « filtre fréquentiel » : elles seront entretenues et les courants vont croître pour des stimulations sonores de même fréquence : c'est la résonance électrique. Une résonance électrique des cellules sensorielles a été observée chez des poissons, des batraciens, de nombreux reptiles (tortue, crocodile, lézards, serpents), et des oiseaux. Les conductances membranaires dépendantes du voltage

dans ces cellules ont été étudiées. Lorsque le courant injecté hyperpolarise la cellule jusqu'à environ -80 mV (potentiel d'équilibre de K^+), il n'y a plus d'apparition de ces oscillations, ce qui suggère le rôle d'un courant K^+ dans la production des oscillations. Le sens du courant, entrant/sortant, s'inverse autour du V_m de repos de la cellule. L'intensité des courants sortants et entrants augmente avec la FC des cellules et la conductance cellulaire globale est proportionnelle à la FC des cellules. La vitesse de l'établissement du courant entrant et celle de la disparition du courant sortant varient avec la fréquence d'oscillation du V_m . L'analyse de la cinétique du courant sortant en fonction de la FC des cellules a permis de montrer que la FC, pour une cellule donnée, est inversement proportionnelle à la racine carrée de la constante de temps (τ) de relaxation du courant ; la membrane se comporte tout à fait comme l'inductance des circuits RLC. Ainsi, τ a une valeur de 150 ms, 6 ms et 0.8 ms pour des cellules dont la FC est respectivement de 20-22 Hz, 100 Hz et 300 Hz. La relation entre la constante de temps de l'établissement du courant et la FC des cellules est plus complexe.

Puis, il a été démontré que le courant K^+ sortant à l'origine des oscillations, est non seulement dépendant du voltage mais aussi de Ca^{2+} . Quant au courant entrant voltage-dépendant impliqué dans les oscillations, il a été défini comme un courant Ca^{2+} , mais sa constante de temps d'établissement est trop faible (inférieure à 0.5 ms), quelle que soit la FC de la cellule, pour rendre compte de la fréquence des oscillations du V_m . C'est donc la cinétique du courant K^+ qui est l'étape limitante dans la détermination de la fréquence de résonance électrique.

Les canaux K^+ impliqués dans le courant sortant ont été caractérisés par des enregistrements unitaires. Ce sont des canaux de type BK. Leur conductance est la même d'une cellule à l'autre, ce qui permet de conclure que c'est la densité de ces canaux qui varie avec la FC de la cellule, expliquant la corrélation entre l'intensité des courants sortants impliqués dans la résonance et la FC de la cellule. Pour un canal BK donné, sa probabilité d'ouverture varie avec le Ca^{2+} et le voltage. Il y a interdépendance des 2 paramètres : plus la membrane est dépolarisée, plus la concentration de Ca^{2+} requise pour l'ouvrir s'abaisse. Le seuil de sensibilité au Ca^{2+} et au changement de voltage s'élève avec la FC de la cellule.

Le nombre des canaux Ca^{2+} dépendant du voltage augmente aussi avec la FC de la cellule. Canaux Ca^{2+} et BK sont colocalisés, une nécessité compte tenu de la forte concentration de Ca^{2+} requise pour ouvrir les canaux BK ($K_{1/2}$ d'environ $12 \mu M$ à 50 mV). Quelle que soit la FC de la cellule, le rapport entre canaux Ca^{2+} dépendant du voltage et canaux BK est de 2. Ces canaux sont associés aux synapses, ce qui permet un couplage entre résonance électrique et relargage du neurotransmetteur, qui est ainsi rythmé par la stimulation.

Le substrat moléculaire de la variation des propriétés cinétiques des canaux BK d'une cellule à l'autre, selon sa FC, a été élucidé par le clonage des gènes

correspondants chez le poulet et la tortue. Les canaux BK ont une structure multimérique, composés de sous-unités α et d'une sous-unité β , dite accessoire. Or la transcription du gène qui code la sous-unité α dans les deux espèces conduit à des transcrits alternatifs par épissage différentiel. Chez le poulet, 8 sites d'épissage alternatif ont été détectés, qui sont susceptibles de conduire à un très grand nombre d'isoformes protéiques. La répartition des différentes isoformes dépend effectivement de la tonotopie. Les courants médiés par les différentes isoformes exprimées dans des cellules HEK après transfection ont des propriétés conformes à celles attendues, compte tenu de la FC des cellules dans lesquelles elles sont présentes. Par ailleurs, le rôle de la sous-unité β a pu être éclairci ; elle augmente la valeur de τ , et l'affinité pour Ca^{2+} . Le mécanisme qui sous-tend cet épissage alternatif tonotopique reste à élucider.

QUELQUES ÉLÉMENTS BIBLIOGRAPHIQUES

1^{er} cours — La membrane basilaire (18-3-2004)

Durrant J.D. & Lovrinic J.H. (1995) *Bases of Hearing Science*. Williams & Wilkins, Baltimore.

Patuzzi R. (1996) Cochlear micromechanics and macromechanics. *In* : Dallos P., Popper A.N., Fay R.R. (eds) *The Cochlea*. Vol. 8. New York : Springer-Verlag, pp. 186-257.

Robles L. & Ruggero M.A. (2001) Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiol. Rev.*, 81, 1305-1352.

Von Békésy G. (1960) *Experiments in Hearing*. McGraw-Hill, New York.

Von Békésy <<http://www.nobel.se/medicine/laureates/1961/bekesy-lecture.html>>

Modèles

De Boer E. (1996) Mechanics of the cochlea : modeling efforts. *In* : Dallos P., Popper A.N., Fay R.R. (eds) *The Cochlea*. Vol. 8. New York : Springer-Verlag, pp. 258-317.

2^e cours — L'amplification, la compression, l'électromotilité, les cellules ciliées externes (25-3-2004)

Brownell W., Bader C., Bertrand D. & de Ribaupierre Y. (1985) Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science*, 227, 194-196.

Gale J.E. & Ashmore J.F. (1997) An intrinsic frequency limit to the cochlear amplifier. *Nature*, 389, 63-66.

Narayan S.S., Temchin A.N., Recio A. & Ruggero M.A. (1998) Frequency tuning of basilar membrane and auditory nerve fibers in the same cochleae. *Science*, 282, 1882-1884.

Kolston P.J. (1999) Comparing *in vitro*, *in situ*, and *in vivo* experimental data in a three-dimensional model of mammalian cochlear mechanics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3676-3681.

Nilsen K.E. & Russell I.J. (2000) The spatial and temporal representation of a tone on the guinea pig basilar membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 11751-11758.

Zheng J., Shen W., He D., Long K., Madison L. & Dallos P. (2000) Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, 405, 149-155.

Brownell W.E., Spector A.A., Raphael R.M. & Popel A.S. (2001) Micro- and nanomechanics of the cochlear outer hair cell. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 3, 169-174.

Oliver D., He D.Z., Klocker N., Ludwig J., Schulte U., Waldegger S., Ruppersberg J.P., Dallos P. & Fakler B. (2001) Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein. *Science*, 292, 2340-2343.

Dallos P. & Fakler B. (2002) Prestin, a new type of motor protein. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 3, 104-111.

Liberman M.C., Gao J., He David Z.Z., Wu X., Jia S. & Zuo J. (2002) Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature*, 419, 300-304.

3^e cours — La membrane tectoriale (1-4-2004)

Zwislocki J.J. & Cefaratti L.K. (1989) Tectorial membrane. II : Stiffness measurements *in vivo*. *Hear Res.*, 42, 211-227.

Gummer A.W., Hemmert W. & Zenner H.-P. (1996) Resonant tectorial membrane motion in the inner ear : its crucial role in frequency tuning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8727-8732.

Abnet C.C. & Freeman D.M. (2000) Deformations of the isolated mouse tectorial membrane produced by oscillatory forces. *Hear Res.*, 144, 29-46.

Legan P.K., Lukashkina V.A., Goodyear R.J., Kossl M., Russell I.J. & Richardson G.P. (2000) A targeted deletion in α -tectorin reveals that the tectorial membrane is required for the gain and timing of cochlear feedback. *Neuron*, 28, 273-285.

Manley G.A. (2000) Cochlear mechanisms from a phylogenetic viewpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 11736-11743.

Freeman D.M., Abnet C.C., Hemmert W., Tsai B.S. & Weiss T.F. (2003) Dynamic material properties of the tectorial membrane : a summary. *Hear Res.*, 180, 1-10.

Freeman D.M., Masaki K., McAllister A.R., Wei J.L. & Weiss T.F. (2003) Static material properties of the tectorial membrane : a summary. *Hear Res.*, 180, 11-27.

4^e cours — La résonance électrique (8-4-2004)

Crawford A.C. & Fettiplace R. (1980) The frequency selectivity of auditory nerve fibres and hair cells in the cochlea of the turtle. *J. Physiol.*, 306, 79-125.

Crawford A.C. & Fettiplace R. (1981) An electrical tuning mechanism in turtle cochlear hair cells. *J. Physiol.*, 312, 377-412.

Art J.J. & Fettiplace R. (1987) Variation of membrane properties in hair cells isolated from the turtle cochlea. *J. Physiol.*, 385, 207-242.

Fettiplace R. (1987) Electrical tuning of hair cells in the inner ear. *Trends Neurosci.*, 10, 421-425.

Art J.J., Wu Y.-C. & Fettiplace R. (1995) The calcium-activated potassium channels of turtle hair cells. *J. Gen. Physiol.*, 105, 49-72.

Navaratnam D.S., Bell T.J., Tu T.D., Cohen E.L. & Oberholtzer J.C. (1997) Differential distribution of Ca²⁺-activated K⁺ channel splice variants among hair cells along the tonotopic axis of the chick cochlea. *Neuron*, 19, 1077-1085.

Rosenblatt K.P., Sun Z.P., Heller S. & Hudspeth A.J. (1997) Distribution of Ca²⁺-activated K⁺ channel isoforms along the tonotopic gradient of the chicken's cochlea. *Neuron*, 19, 1061-1075.

Jones E.M., Laus C. & Fettiplace R. (1998) Identification of Ca²⁺-activated K⁺ channel splice variants and their distribution in the turtle cochlea. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 265, 685-692.

Fettiplace R. & Fuchs P.A. (1999) Mechanisms of hair cell tuning. *Annu. Rev. Physiol.*, 61, 809-834.

Jones E.M., Gray-Keller M. & Fettiplace R. (1999) The role of Ca²⁺-activated K⁺ channel spliced variants in the tonotopic organization of the turtle cochlea. *J. Physiol.*, 518, 653-665.

Ricci A.J., Gray-Keller M. & Fettiplace R. (2000) Tonotopic variations of calcium signalling in turtle auditory hair cells. *J. Physiol.*, 524, 423-436.

ACTIVITÉ DE RECHERCHE DU LABORATOIRE

Notre activité 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 sous-tendent 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 des « modules » développementaux et/ou fonctionnels, le laboratoire met aujourd'hui en œuvre des approches complémentaires, en particulier pour tenter de comprendre la transduction mécano-électrique auditive.

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

Le gène responsable de la surdité DFNB27 a été isolé au laboratoire. L'inactivation du gène correspondant chez la souris est en cours, pour tenter de comprendre la pathogenèse de cette atteinte.

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

II.1. Touffe ciliaire

II.1.1. Caractérisation biochimique et fonctionnelle de la stéréociline

Nous avons montré que les mutations du gène *STRC* sont responsables de la surdité isolée récessive DFNB16. L'ADNc murin, isolé à partir d'épithélium vestibulaire, code pour une protéine de 1809 acides aminés, sans homologie avec des protéines connues, contenant un peptide signal probable et plusieurs segments relativement hydrophobes. Pour déterminer la fonction de cette protéine, sa localisation au sein de l'oreille interne, du testicule et de l'œil, et ses caractéristiques biochimiques ont été étudiées, ses ligands ont été recherchés, et l'inactivation par recombinaison homologue du gène chez la souris, mise en œuvre.

Nos résultats suggèrent qu'il existe de nombreuses isoformes de la stéréociline. Dans l'oreille interne, la stéréociline est transmembranaire. Elle est localisée, chez l'adulte, tout le long du kinocil des cellules sensorielles du vestibule. Dans la cochlée, elle est présente dans les cellules ciliées externes au niveau des liens interstéréociliaires et à l'extrémité apicale des stéréocils les plus hauts qui sont ancrés dans la membrane tectoriale. Dans l'œil, la protéine a été mise en évidence dans la zonule, le ligament qui maintient le cristallin en place, dans la cornée et la sclère, ainsi qu'au niveau de certaines jonctions cellulaires. Dans le testicule, la stéréociline est détectée dans l'albuginée et dans la capsule fibreuse des tubes séminifères, ainsi que dans les spermatides en allongement au niveau de la manchette (structure microtubulaire transitoire qui forme un manchon autour de la partie caudale du noyau) et des flagelles.

Trois ligands potentiels de la stéréociline, obtenus par le système du double-hybride dans la levure, ont retenu notre attention : la métallocarboxypeptidase CPX-2 dont la localisation et la fonction sont inconnues, l'harmonine, et la plectine. Cette dernière connecte les filaments intermédiaires aux microfilaments, aux microtubules et aux desmosomes. La validité de ces ligands doit être établie.

Nos différents résultats suggèrent plusieurs fonctions possibles pour la stéréociline au sein de l'oreille interne : l'ancrage des membranes acellulaires aux cellules sensorielles, le maintien de la cohésion de la touffe ciliaire des cellules senso-

rielles et la protection contre le stress mécanique. L'analyse des souris déficientes en stéréociline devrait permettre de conclure.

II.1.2. Croissance des stéréocils

Le rôle de la whirline et de la myosine XV, dont le déficit conduit à des stéréocils de taille anormalement courte, a été étudié par analyse en immunohistofluorescence de leur localisation subcellulaire au cours de la croissance de la touffe ciliaire et par analyse biochimique. Les résultats indiquent que l'interaction de ces deux protéines au sommet du stéréocil est essentielle au contrôle de la croissance stéréociliaire qu'elles exercent.

II.1.3. Cohésion de la touffe ciliaire

Par l'étude de trois protéines, myosine VIIa, harmonine et cadhérine-23, chacune étant défectueuse dans une forme du syndrome de Usher (association d'une cécité et d'une surdité), nous avons proposé un scénario moléculaire dans lequel ces protéines interagissent pour maintenir la cohésion de la touffe ciliaire. Ce réseau a été enrichi de la protocadhérine-15 et de la protéine SANS (protéine du cytosquelette composée d'un domaine SAM et de 3 répétitions ankyrine), toutes deux défectueuses dans 2 autres formes du syndrome de Usher de type I. SANS interagit avec l'harmonine et la myosine VIIa. Sa localisation, sous la touffe ciliaire, associée aux vésicules, indique qu'elle contrôle le trafic de la myosine VIIa et de l'harmonine qui sont présentes, comme la cadhérine-23 et l'harmonine, dans la touffe ciliaire.

II.2. Synapse à rubans des cellules ciliées internes : 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 (CCI) 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, d'autant plus que le petit nombre de CCI 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 montré que l'otoferline, une protéine transmembranaire à domaines C2, défectueuse dans la surdité humaine DFNB9, pourrait être un composant de

la machinerie synaptique de la CCI. Ainsi, par immunohistofluorescence, nous avons étudié la localisation de l'otoferline dans la cochlée de souris et examiné ses propriétés biochimiques par rapport au complexe SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (SNAP) receptors*), comprenant notamment la syntaxine-1 et SNAP25. Finalement, nous avons exploré l'effet de l'otoferline sur l'exocytose des granules de sécrétion dans les cellules PC12 et les cellules chromaffines exprimant la protéine après transfection. Par immunohistofluorescence, nous avons pu montrer que la distribution de l'otoferline dans les cellules ciliées durant le développement était parallèle à la synaptogenèse. En utilisant la microscopie électronique et l'immunohistochimie à l'or colloïdal, nous avons observé que l'otoferline est localisée autour du ruban et associée à la membrane présynaptique des CCI adultes. L'otoferline est colocalisée avec les marqueurs présynaptiques et interagit avec la syntaxine-1 et SNAP25, deux protéines du complexe SNARE, d'une manière dépendante de Ca^{2+} . L'otoferline est capable de former des oligomères *in vitro*. Finalement, nous avons montré par des mesures ampérométriques, que la présence d'otoferline dans les cellules chromaffines en culture primaire augmente la taille des événements unitaires de l'exocytose. Cet effet n'a pas été observé avec deux formes mutées de la protéine comportant une substitution d'acide aminé connue pour être responsable de la surdité DFNB9. Nos résultats suggèrent que l'otoferline est un détecteur de Ca^{2+} qui module la libération du neurotransmetteur par la CCI. L'inactivation du gène, qui est en cours, est indispensable pour clarifier le rôle *in situ* de l'otoferline.

III. PHYSIOLOGIE MOLÉCULAIRE DE LA CELLULE SENSORIELLE — AUTRES APPROCHES

III.1. Transduction mécano-électrique

III.1.1. Identification de ses composants moléculaires

La cochlée échappe à l'analyse moléculaire par les méthodes classiques en raison du petit nombre de cellules sensorielles (cellules ciliées) qu'elle abrite, environ 3 000. 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 non encore identifié. Un vaste criblage d'une soixantaine de canaux cationiques non sélectifs et de messagers secondaires a donc été entrepris par RT-PCR sur cellule sensorielle unique. Ce criblage s'est focalisé sur trois familles de canaux : TRP (*transient receptor potential*), KCNK, et HCN, et sur deux familles de messagers secondaires de canaux : l'AMP cyclique (suivi par l'activité adénylate cyclase) et les β -transducines. Ce choix

de molécules se justifie par des résultats obtenus chez le poisson zébré et la drosophile, espèces chez lesquelles le complexe de transduction mécano-électrique a été en partie élucidé. Parmi la soixantaine de molécules testées par cette technique chez la souris, 16 ARN messagers ont été détectés dans les cellules ciliées externes aux stades 6 et 11 jours postnatals. La présence des molécules détectées dans les cellules ciliées externes a par la suite été contrôlée dans les cellules ciliées internes. L'obtention d'anticorps nous a ensuite permis de localiser plusieurs de ces canaux dans la touffe ciliaire. Pour plusieurs de ces gènes, la production de souris mutantes est en cours.

III.1.2. Mécanismes moléculaires de l'adaptation auditive : PHRET, un ligand commun à la myosine VIIa et la myosine 1c, 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. Il y a plusieurs années, nous avons isolé et caractérisé la myosine 1c, l'orthologue murin de la myosine 1 β du crapaud, impliquée dans l'adaptation. Afin de comprendre comment la myosine 1c exerce sa fonction dans la touffe ciliaire, nous avons entrepris d'identifier ses partenaires de liaison, aucun des ligands de cette protéine n'ayant été caractérisé à ce jour. Pour cela, la queue de la myosine 1c a été utilisée comme appât pour cribler une banque double-hybride issue de l'oreille interne. Parmi les ligands potentiels identifiés, nous nous sommes intéressés à la protéine Phret. Elle comporte quatre isoformes toutes porteuses d'un domaine pleckstrine (ou PH pour *Pleckstrin Homology*) au niveau de l'extrémité N-terminale, ainsi que d'un domaine transmembranaire en C-terminal. Dans l'oreille interne, Phret1/2 sont présentes dans les touffes ciliaires des cellules ciliées cochléaires et vestibulaires, où elles sont colocalisées avec la myosine 1c. L'interaction directe entre la myosine 1c et Phret a été confirmée. Par l'intermédiaire de deux cribles double-hybride utilisant Phret1 et Phret2 comme appâts, et par des tests de liaison *in vitro*, nous avons pu montrer que Phret1 et Phret2 sont capables de former des homo- et/ou des hétéromères, et que Phret interagit aussi avec la queue de la myosine VIIa. La définition fine des sites d'interaction de la myosine 1c et de la myosine VIIa avec Phret a permis de montrer que les deux myosines se lient à la région C-terminale du domaine PH de Phret. Cependant, l'oligomérisation de Phret que nos expériences suggèrent, ouvre la possibilité théorique supplémentaire d'une interaction de Phret à la fois avec la myosine 1c et la myosine VIIa. Au sommet du stéréocil, Phret et les deux myosines seraient impliquées dans l'adaptation lente en régulant la tension du domaine membranaire associé à la machinerie de mécanotransduction.

La stoechiométrie de ces interactions, leur affinité respective, et leur nature compétitive ou non restent à définir. Quoi qu'il en soit, il est probable que

l'oligomérisation de Phret à elle seule, accroît la tension membranaire que peut exercer la myosine 1c.

III.2. La kinociline, une protéine du kinocil

Un produit différentiel *L5*, que nous avons isolé d'une banque soustraite d'épithéliums sensoriels vestibulaires, élaborée il y a quelques années, a retenu notre attention. L'expression du gène *L5* (étudiée par RT-PCR et Northern blot) n'est certes pas restreinte à l'oreille interne, mais c'est dans cet organe qu'elle est la plus forte. L'ADNc murin *L5* code pour une protéine de 124 acides aminés qui ne présente aucune homologie avec des protéines connues. Cette protéine contient deux segments transmembranaires potentiels.

L'étude de la dynamique d'expression de la protéine *L5* dans les cellules sensorielles effectuée avec 2 anticorps dirigés contre 2 épitopes distincts de la protéine, a conduit aux résultats suivants :

- La protéine est principalement localisée dans le kinocil des cellules sensorielles du vestibule et de la cochlée et nous avons donc nommé cette protéine kinociline.
- La kinociline est détectée dès le stade embryonnaire 14.5 (E14.5) dans le vestibule et E18.5 dans la cochlée. Le kinocil, seul véritable cil des cellules sensorielles, jouerait un rôle essentiel dans l'établissement de la polarité planaire des cellules ciliées.
- Dans la cochlée, après la disparition du kinocil (entre 8 et 12 jours post-natals chez la souris), la kinociline se redistribue à l'apex des cellules sensorielles. Elle est alors présente autour de la plaque cuticulaire où elle est colocalisée avec un anneau microtubulaire, au niveau du corps basal et à la base des stéréocils.
- La kinociline est également présente dans deux types de cellules de soutien très spécialisées de la cochlée et caractérisées par leur richesse en microtubules : les cellules de Deiters et les cellules piliers.

L'ensemble de ces données suggère que la kinociline est associée (directement ou non) aux divers réseaux microtubulaires présents dans l'oreille interne. Cependant, parce que la plupart de ces réseaux correspondent à des régions d'intense trafic vésiculaire et parce que la kinociline pourrait être transmembranaire, il n'est pas exclu que la protéine puisse interagir avec les membranes des vésicules et être impliquée dans leur transport.

Nous réalisons actuellement une inactivation conditionnelle et une inactivation ubiquitaire du gène *L5*, qui devraient nous permettre de répondre aux interrogations suivantes :

- Quel est le devenir de la ciliogénèse en absence de kinociline ? Et à quel point la perturbation de la formation du kinocil affecte-t-elle la croissance et la polarité de la touffe ciliaire (composée de microvillosités d'actine) ?
- La kinociline est-elle essentielle pour le maintien des réseaux microtubulaires de l'oreille interne et/ou pour le fonctionnement du trafic vésiculaire ?
- Quelle est l'importance fonctionnelle de cette protéine dans d'autres tissus où nous l'avons détectée ?

IV. RÔLE DES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LE FONCTIONNEMENT COCHLÉAIRE

Les connexines sont les constituants des jonctions intercellulaires communicantes (*gap junctions*) qui permettent l'échange entre deux cellules de molécules d'une masse inférieure à 1 kDa (ions, seconds messagers, ou métabolites). Elles jouent un rôle essentiel dans l'audition. En effet, des mutations dans différentes connexines (*CX26*, *CX30*, *CX31*, *CX43*) sont responsables de surdités isolées ou syndromiques chez l'homme. Afin de comprendre le rôle des jonctions communicantes dans la physiologie de l'audition, nous générons et caractérisons des lignées de souris déficientes pour les connexines majeures de l'oreille interne, Cx26 et Cx30.

Une dissection fine du rôle des Cx26 et Cx30 de l'oreille interne est en cours. Nous tentons d'inactiver *Cx26* et *Cx30* dans différents types cellulaires de l'oreille interne. Dans ce but, 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 et/ou dans les fibrocytes de l'oreille interne.

Les souris *Cx30*^{-/-} (inactivation ubiquitaire) présentent une surdité profonde (seuil d'audition >100 dB) due à l'absence de production du potentiel endocochléaire (PE) dans la strie vasculaire. Or, aucune anomalie morphologique ne permet d'expliquer l'absence du PE chez ces souris. Nous pensons donc que ce phénotype pourrait être le résultat d'anomalies dans l'expression de gènes plus directement impliqués dans la production du PE. Une analyse différentielle du transcriptome cochléaire chez la souris *Cx30*^{-/-} est actuellement en cours.

Par ailleurs, dans le but de comprendre comment se forment et se maintiennent les « *gap junctions* », les ligands des connexines ont été recherchés par la technique de double hybride dans la levure. L'un d'eux, « contig 49 », est étudié. D'expression ubiquitaire, il interagit avec les filaments intermédiaires de kératine, et pourrait être impliqué dans l'adressage membranaire des connexines, voire d'autres protéines transmembranaires.

V. ÉPIDÉMIOLOGIE DES SURDITÉS HÉRÉDITAIRES

L'objectif est d'établir l'épidémiologie des surdités héréditaires et d'apporter une description clinique fine de chacune des formes de surdité. Nous nous sommes d'abord concentrés sur les formes les plus fréquentes, c'est-à-dire l'atteinte des gènes *CX26* et *CX30* qui codent respectivement la connexine26 et la connexine30, ainsi que celle du gène *PDS* qui code la pendrine. Parce que les mutations peuvent éclairer la physiopathologie moléculaire, nous nous sommes aussi intéressés à celle de l'otoferline.

Inclusions des patients

Les informations cliniques pour 1 407 patients sourds issus de 1 012 familles ont été recueillies. Des prélèvements sanguins correspondant à ces familles (minimum un prélèvement par famille) ainsi que les ADNs extraits ont été stockés dans la banque du laboratoire.

Gène de la connexine26 et délétion de la connexine30

Un séquençage du gène *CX26* et la recherche d'une large délétion du gène *CX30* (délétion qui a été retrouvée *en trans* chez des patients sourds hétérozygotes pour une mutation de *CX26*) ont été effectués dans 255 cas indépendants chez lesquels le phénotype de la surdité était compatible avec l'atteinte de ces gènes et aucune cause infectieuse ne pouvait être retenue. Une mutation bi-allélique de *CX26* a été retrouvée dans 32 % (81/255) des cas, une mutation mono-allélique de *CX26* sans délétion de *CX30* dans 5 % (14/255) des cas, une mutation mono-allélique de *CX26* associée à une délétion de *CX30* dans 6 % (15/255), aucune mutation de *CX26*, ni délétion de *CX30* dans 43 % (145/255) et une délétion hétérozygote isolée de *CX30*, dans un cas. La répartition des différents génotypes dans les formes familiales n'est pas significativement différente de celle retrouvée dans les formes sporadiques. Ceci indique que les causes infectieuses passées inaperçues, qui longtemps ont été proposées comme la cause de nombreux cas sporadiques de surdité, sont inexistantes ou marginales. Les cas sporadiques de surdité de l'enfant correspondent à des formes héréditaires de transmission autosomique récessive. Les pourcentages de mutation bi-allélique de *CX26* et de mutation mono-allélique de *CX26* associée à une délétion de *CX30* sont significativement plus élevés dans les formes de surdité profonde et sévère que dans les cas de surdité moyenne et légère. L'aggravation du déficit auditif est significativement plus fréquente chez les patients ne présentant aucune mutation.

Une seconde étude ayant pour but d'établir des relations génotype/phénotype a été menée chez 265 porteurs de mutations bi-alléliques de *CX26*. Vingt-neuf variants différents ont été identifiés, dont deux (V37I et L90P) étaient associés à une surdité moins sévère. L'évolutivité du déficit auditif et la variabilité intrafamiliale ont également été étudiées.

Étude de variants du gène *CX26*

La mutation M34T de *CX26* a tout d'abord été rapportée comme étant responsable d'une forme de surdité autosomique dominante puis d'autres travaux l'ont impliquée dans les formes autosomiques récessives. Nous avons identifié la mutation M34T dans 11 cas de surdité isolée : 4 cas sporadiques et 7 formes familiales. Dans 6 de ces familles, la ségrégation de la mutation M34T ne correspond pas à celle de la surdité. Ces résultats sont en faveur du fait que la mutation M34T de *CX26* est un simple variant polymorphe.

G ne *PDS (SLC26A4)*

Le gène codant pour la pendrine (transporteur d'anions) est responsable du syndrome de Pendred, qui associe une surdité avec malformation de l'oreille interne à un goitre thyroïdien. Ce gène est également responsable de la surdité isolée DFNB4. Des mutations de ce gène ont été recherchées chez 30 patients atteints du syndrome de Pendred et chez 112 patients atteints de surdité isolée avec malformation de l'oreille interne observée au scanner mais ne présentant pas d'atteinte thyroïdienne. Des mutations du gène *PDS* sont retrouvées chez 90 % des patients atteints du syndrome de Pendred, et chez 38 % de ceux qui présentent une surdité isolée avec malformation(s) de l'oreille interne. De nouveaux critères cliniques ont ainsi pu être définis qui permettent de guider le diagnostic moléculaire devant une surdité isolée.

G ne *OTOF* codant l'otoferline

Le gène *OTOF* a été découvert par notre laboratoire comme responsable de la forme de surdité isolée récessive DFNB9. Afin d'examiner la fréquence de l'implication de ce gène parmi les surdités isolées, dans 100 familles atteintes de surdité isolée profonde ou sévère et ne présentant pas d'anomalie de *CX26*, l'implication du gène *OTOF* a été examinée par analyse de liaison génétique, suivie du séquençage du gène. Aucune mutation n'a été trouvée. En revanche, en nous intéressant exclusivement aux rares cas de surdité dans lesquels il y a persistance des otoémissions acoustiques, nous avons trouvé chez 4 enfants non apparentés atteints d'une surdité prélinguale profonde, une mutation dans le gène *OTOF*.

VI. DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME OLFACTIF ET SYNDROME DE KALLMANN

Le syndrome de Kallmann de Morsier est une maladie génétique humaine qui affecte la morphog nese des bulbes olfactifs et la migration embryonnaire des neurones à GnRH vers le cerveau. Les deux gènes qui ont été impliqués dans la maladie à ce jour, ont été identifiés par notre laboratoire. *KALI*, responsable

de la forme récessive liée au chromosome X, code l'anosmine-1, un composant de diverses matrices extracellulaires durant l'organogenèse, nécessaire au branchement des axones des cellules mitrales des bulbes olfactifs. *KAL2*, responsable d'une forme autosomique dominante de la maladie (travail réalisé en collaboration avec Catherine Dodé, Institut Cochin), code *FGFR1* (« *Fibroblast Growth Factor Receptor-1* »). Ceci suggère que l'anosmine-1 est impliquée dans la signalisation par les FGFs.

En utilisant le poisson zébré (*Danio rerio*) comme nouveau modèle pour étudier la fonction de l'anosmine-1, nous venons de montrer que cette protéine joue un rôle essentiel dans les migrations cellulaires qui accompagnent la formation de la ligne latérale chez les poissons. La ligne latérale est un système sensoriel propre aux poissons et aux amphibiens, homologue au système auditif. Une ébauche de ce système est mise en place à partir d'un primordium qui migre le long des flancs du poisson. Ce primordium dépose à intervalles réguliers quelques cellules qui formeront un petit organe sensoriel, le neuromaste, qui détecte les mouvements liquidiens engendrés par les proies et les prédateurs. Des travaux antérieurs du laboratoire avaient montré que les deux orthologues du gène *KAL1* chez le poisson zébré (les gènes *kall.1* et *kall.2*) sont exprimés dans le primordium de la ligne latérale tout au long de sa migration. Avec des anticorps spécifiquement dirigés contre les protéines codées par chacun des deux gènes, nous avons récemment mis en évidence une accumulation de l'anosmine1.1 et de l'anosmine1.2 dans les neuromastes (au niveau des cellules ciliées). De plus, par l'injection de morpholinos spécifiquement dirigés contre chacun des 2 gènes, nous avons montré que l'inactivation de *kall.1*, mais pas celle de *kall.2*, supprime complètement la formation des neuromastes. Cette absence est due à un défaut de migration du primordium de la ligne latérale. Le gène *kall.1* joue donc un rôle essentiel dans la migration de ce primordium. Le gène *kall.2*, bien que non essentiel, pourrait être impliqué dans la régulation fine de cette migration.

PUBLICATIONS

2003

Bruzzone R., Veronesi V., Gomès D., Bicego M., Duval N., Marlin S., Petit C., D'Andrea P. & White T.W. (2003) Loss-of-function and residual channel activity of connexin26 mutations associated with non-syndromic deafness. *FEBS Lett*, 533, 79-88.

del Castillo I., Moreno-Pelayo M.A., del Castillo F.J., Brownstein Z., Marlin S., Adina Q., Cockburn D.J., Pandya A., Siemering K.R., Chamberlin G.P., Ballana E., Wuyts W., Maciel-Guerra A.T., Álvarez A., Villamar M., Shohat M., Abeliovich D., Dahl H.-H.M., Estivill X., Gasparini P., Hutchin T., Nance W.E., Sartorato E.L., Smith R.J.H., Van Camp G., Avraham K.B., Petit C. & Moreno F. (2003) Prevalence and evolutionary origins of the del (*GJB6-D13S1830*) mutation

in the *DFNBI* locus in hearing impaired subjects : a multicentric study. *Am. J. Hum. Genet.*, 73 (sous presse).

Dellovade T.L., Hardelin J.-P., Soussi-Yanicostas N., Pfaff D.W., Schwanzel-Fukuda M. & Petit C. (2003) Anosmin-1 immunoreactivity during embryogenesis in a primitive eutherian mammal. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 140, 157-167.

Delmaghani-Khameneh S., Aghaie A., Ataie A., Lemainque A., Zeinali S., Lathrop M., Weil D. & Petit C. (2003) DFNB40, a recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 22q11.21-12.1. *Eur. J. Hum. Genet.*, 11, 816-818.

Desnos C., Schonn J.-S., Huet S., Tran V.S., El-Amraoui A., Raposo G., Fanget I., Chapuis C., Ménasché G., de Saint Basile G., Petit C., Cribier S., Henry J.-P. & Darchen F. (2003) Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J. Cell. Biol.*, 163, 559-570.

Dodé C., Levilliers J., Dupont J.-M., De Paepe A., Le Dû N., Soussi-Yanicostas N., Coimbra R.S., Delmaghani S., Compain-Nouaille S., Baverel F., Pêcheux C., Le Tessier D., Cruaud C., Delpech M., Speleman F., Vermeulen S., Amalfitano A., Bachelot Y., Bouchard P., Cabrol S., Carel J.-C., Delemarre-van de Waal H., Goulet-Salmon B., Kottler M.-L., Richard O., Sanchez-Franco F., Saura R., Young J., Petit C. & Hardelin J.-P. (2003) Loss-of-function mutations in *FGFR1* cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nature Genet.*, 33, 463-465.

Hardelin J.-P., Levilliers J. & Petit C. (2003) Deafness : Hereditary. In : Cooper DN (ed) Nature Encyclopedia of the Human Genome. London, UK : Nature Publishing Group, pp. 1065-1071.

Jawaheer D., Juo S.-H., Le Caignec C., David A., Petit C., Gregersen P., Dowbak S., Damle A., McElreavey K. & Ostrer H. (2003) Mapping a gene for 46,XY gonadal dysgenesis by linkage analysis. *Clin. Genet.*, 63, 530-535.

Liu X.Z., Ouyang X.M., Xia X.J., Zheng J., Pandya A., Li F., Du L.L., Welch K.O., Petit C., Smith R.J., Webb B.T., Yan D., Arnos K.S., Corey D., Dallos P., Nance W. & Chen Z.Y. (2003) Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss. *Hum. Mol. Genet.*, 12, 1155-1162.

Masmoudi S., Tlili A., Majava M., Ghorbel A.M., Chardenoux S., Lemainque A., Ben Zina Z., Moala J., Männikkö M., Weil D., Lathrop M., Alakokko L., Drira M., Petit C. & Ayadi H. (2003) Mapping of a new autosomal recessive nonsyndromic hearing loss locus (DFNB32) to chromosome 1p13.3-22.1. *Eur. J. Hum. Genet.*, 11, 185-188.

Mburu P., Mustapha M., Varela A., Weil D., El-Amraoui A., Holme R.H., Rump A., Hardisty R.E., Blanchard S., Coimbra R.S., Perfettini I., Parkinson N., Mallon A.-M., Glenister P., Rogers M.J., Paige A.J., Moir L., Clay J., Rosenthal A., Liu X.-Z., Blanco G., Steel K.P., Petit C. & Brown S.D.M. (2003)

Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with mutations in DFNB31. *Nature Genet.*, 34, 421-428.

Michel V., Hardelin J.-P. & Petit C. (2003) Molecular mechanism of a frequent genetic form of deafness. *New Engl. J. Med.*, 349, 716-717.

Modamio-Hoybjør S., Moreno-Pelayo M.A., Mencía A., del Castillo I., Charde-noux S., Armenta D., Lathrop M., Petit C. & Moreno F. (2003) A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (DFNA44) maps to chromo-some 3q28-29. *Hum. Genet.*, 112, 24-28.

Modamio-Hoybjør S., Moreno-Pelayo M.A., Mencía A., del Castillo I., Charde-noux S., Morais D., Lathrop M., Petit C. & Moreno F. (2003) A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA50, maps to chromo-some 7q31-q32 between the DFNB17 and DFNB13 deafness loci. *J. Med. Genet.* (sous presse).

Moreno-Pelayo M.A., Modamio-Hoybjør S., Mencía A., del Castillo I., Charde-noux S., Fernández-Burriel M., Lathrop M., Petit C. & Moreno F. (2003) DFNA49, a novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, maps proximal to DFNA7/DFNM1 region on chromosome 1q21-q23. *J. Med. Genet.*, 40, 832-836.

Reiners J., Reidel B., El-Amraoui A., Boëda B., Huber I., Petit C. & Wol-frum U. (2003) Differential distribution of harmonin isoforms and their possible role in Usher-1 protein complexes in mammalian photoreceptor cells. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.* 44, 5006-5015.

Teubner B., Michel V., Pesch J., Lautermann J., Cohen-Salmon M., Söhl G., Jahnke K., Winterhager E., Herberhold C., Hardelin J.-P., Petit C. & Willecke K. (2003) Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum. Mol. Genet.*, 12, 13-21.

Waselle L., Coppola T., Fukuda M., Iezzi M., El-Amraoui A., Petit C. & Regazzi R. (2003) Involvement of the Rab27 binding protein Slac2c/MyRIP in insulin exocytosis. *Mol. Biol. Cell.*, 14, 4103-4113.

Weil D., El-Amraoui A., Masmoudi S., Mustapha M., Kikkawa Y., Lainé S., Delmaghani S., Adato A., Nadifi S., Ben Zina Z., Hamel C., Gal A., Ayadi H., Yonekawa H. & Petit C. (2003) Usher syndrome type I G (USH1G) is caused by mutations in the gene encoding SANS, a protein that associates with the USH1C protein, harmonin. *Hum. Mol. Genet.*, 12, 463-471.

2004

Adato A., Kikkawa Y., Alagramam K.N., Weil D., Yonekawa H., El-Amraoui A. & Petit C. (2004) Interactions in the Usher syndrome type I proteins network (sous presse).

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.

Delprat B., Michel V., Perfettini I., Michalski N., El-Amraoui A., Legrain P., Goodyear R., Richardson G., Hardelin J.-P. & Petit C. (2004) Protein interactions of Whirlin, a PDZ domain-containing protein : myosinXV directly binds to whirlin to ensure the growth of the hair bundle stereocilia (sous presse).

El-Amraoui A., Etournay R., Blanchard S., Pezeron G., Michalski N., Perfettini I., Legrain P. & Petit C. (2004) Phret, a transmembrane protein, directly interacts with two adaptation motors, myosin Ic and myosin VIIa in the mechanosensory hair bundle (soumis).

Feldmann D., Denoyelle F., Chauvin P., Garabedian E.-N., Couderc R., Odent S., Joannard A., Schmerber S., Delobel B., Leman J., Journal H., Catros H., Le Marechal C., Dollfus H., Eliot M.-M., Delaunoy J.-P., David A., Calais C., Drouin-Garraud V., Obstoy M.-F., Bouccara D., Sterkers O., Tran Ba Huy P., Goizet C., Duriez F., Fellmann F., Helias J., Vigneron J., Montaut B., Lewin P., 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.

Hardelin J.-P., Denoyelle F., Levilliers J., Simmler M.-C. & Petit C. (2004) Les surdités héréditaires : génétique moléculaire. *Med. Sci. (Paris)* 20, 311-316.

Dodé C. & Hardelin J.-P. (2004) Syndrome de Kallmann de Morsier : insuffisance de signalisation par les FGF ? *Med. Sci. (Paris)*, 20, 793-798.

Hildebrand M.S., de Silva M.G., Klockars T., Rose E., Welsh M.J., Price M., Smith R.J., McGuirt W., Christopoulos H., Petit C. & Dahl H.-H.M. (2004) Characterization of DRASIC in the mouse inner ear. *Hear Res.*, 190, 149-160.

Masmoudi S., Charfedine I., Ben Rebeh I., Rebai A., Tlili A., Ghorbel A.M., Belguith H., Petit C., Drira M. & Ayadi H. (2004) Refined mapping of the autosomal recessive nonsyndromic deafness locus DFNB13 using 8 novel microsatellite markers. *Clin. Genet.*, 66, 358-364.

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.

Roux I., Safieddine S., Guillaumie K., Nouvian R., Grati Mh., Rostaing P., Hardelin J.-P., Triller A., Moser T., Darchen F. & Petit C. (2004) Otoferlin, defective in DFNB9 human deafness, is a synaptic protein of sensory hair cells that regulates endocytosis (soumis).

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., Stratakis C.A., Weil D., Petit C. & Hildebrandt F. (2004) *SIX1* mutations cause branchio-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.

SÉMINAIRES ET CONFÉRENCES SUR INVITATION

Fondation Ipsen 20th Anniversary « *From brain to mind* », Collège de France, 8 septembre 2003

« From gene to function : unravelling the sensory systems through the study of their inherited defects. The paradigm of deafness »

Workshop on Motion, Sensation, and Self-Organization in Living Cells, Max Planck Institute for Physics of Complex Systems, Dresden, Allemagne, 20-24 Octobre 2003

« Deciphering of the molecular mechanisms underlying the cohesion of the hair bundle through deafness genes »

Colloque « *Le cerveau dans la petite Enfance et les Troubles de son Développement* », Académie des Sciences, Académie Nationale de Médecine, 13 novembre 2003

« Surdités héréditaires : analyse génétique du développement de l'oreille interne »

Journée de Génétique Humaine, *De la clinique au fondamental*, Institut de Génétique Humaine, Montpellier, 12 décembre 2003

« Des gènes impliqués dans la surdité aux mécanismes contrôlant le développement et le fonctionnement de la cochlée »

ARO (Association for Research in Otolaryngology) **27th Annual Midwinter Research Meeting**, Daytona Beach, USA 21-25 février 2004

Organisatrice du symposium « *Cell adhesion : lessons for the development and the physiology of the hair cells* »

Laboratoire de **Biologie des Interactions Neurones/Glie**, Hôpital de la Salpêtrière, 1^{er} mars 2004

« Des gènes impliqués dans la surdité aux mécanismes moléculaires qui sous-tendent le développement et le fonctionnement de la cochlée »

Prix l'Oréal-UNESCO, Académie des Sciences, 10 mars 2004

« Pour l'élucidation des défauts génétiques responsables de la surdité héréditaire et d'autres troubles sensoriels »

Judis Académiques de l'Université de Genève, Suisse, 29 avril 2004

« Surdités héréditaires : gènes, diagnostic moléculaire et physiopathologie »

Colloque « *Nouvelles Approches en Neurosciences et Maladies du Système Nerveux Central* », Académie des Sciences, 10-12 mai 2004

« Human hereditary deafness. Unravelling the developmental and physiological molecular mechanisms of the sensory hair cells »

Mercredis de l'IFR, Necker-Enfants Malades, 2 juin 2004

« Surdité héréditaire humaine : contribution à la compréhension de la physiologie et la physiopathologie moléculaires de la cochlée »

Les Mardis de l'Institut Pasteur, Institut Pasteur, 8 juin 2004

« Surdité humaine : la part de l'hérédité ; comment les gènes de surdité éclairent la compréhension du développement et du fonctionnement de l'oreille interne »

Les Défis du 21^e siècle, Académie des Sciences, 29 juin 2004

« De la génétique des maladies à la physiologie : rupture ou continuité ? »

Barany Society XXIII International Congress, Collège de France, 7-9 juillet 2004

« Genetic basis of deafness »

FENS Forum 2004 (Federation of the European Neuroscience Societies), Lisbon, Portugal, 10-14 juillet 2004

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

European Alpbach Technology Forum (Federation of Austrian Industry), *Borders, Bridges, Interactions*, Alpbach, Autriche, 26-28 août 2004

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

XXIV^e Congrès de la Société de Biomécanique, *Mécanotransduction*, Créteil, 8-10 septembre 2004

« Transduction mécano-électrique auditive »

ENSEIGNEMENT

1. Enseignement au titre du Collège de France

1.a. Cours au Collège de France (6 heures) Les jeudis 18 mars, 25 mars, 1^{er} et 8 avril 2004

« **Mécanismes d'analyse des fréquences sonores** »

1.b. Cours à l'étranger :

• SFAX — **Tunisie** (3 heures)

27 janvier 2004 — Invitants : Pr H. AYADI, Faculté de Médecine de SFAX & Hamed BEN DHIA, Président de l'Université de Sfax

« **Micromécanique cochléaire : analyse fréquentielle et amplification du signal sonore** »

1.c. Séminaires (durée de chaque séminaire : 1 h 30) 7, 14 et 28 mai, 4, 11 et 18 juin 2004

En relation avec le cours

Ian J. RUSSELL (7 mai 2004)

School of Biological Sciences, The University of Sussex, Brighton, UK

« **New insights into the role of the tectorial membrane in cochlear mechanics** »

Peter GILLESPIE (14 mai 2004)

Oregon Hearing Research Center & Vollum Institute, Oregon Health & Science University, Portland, USA

« **Adaptation by hair cells** »

Daniel ROBERT (28 mai 2004)

School of Biological Sciences, University of Bristol, Bristol, UK

« **La mécanique ultraprécise des organes auditifs chez les insectes** »

Bernd FAKLER (4 juin 2004)

Department of Physiology II, University of Freiburg, Freiburg, Allemagne

« **Molecular aspects of prestin, the motor protein of cochlear outer hair cells** »

Christine KOEPL (11 juin 2004)

Institut für Zoologie, Technische Universität München, Garching, Allemagne

« **Evolution of the vertebrate hearing organ and its innervation** »

Pascal MARTIN (18 juin 2004)

UMR 168 CNRS — Physicochimie, Institut Curie, Paris

« **Comment l'oreille écoute pour entendre : amplification mécanique par mouvements actifs de la touffe ciliaire des cellules ciliées** »

2. Enseignements autres

DEA Génétique Moléculaire des Maladies du Développement et de l'Oncogénèse, Université Paris V, 18 novembre 2003

« Surdités héréditaires »

École Normale Supérieure, Cours d'introduction à la biologie pour les élèves physiciens et chimistes de l'ENS, 21 janvier 2004

3. *Jury de thèses*

Anne HOUDUSSE, Habilitation à Diriger des Recherches, 2 février 2004

Samuel SIDI, thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, 4 mai 2004

4. *Rencontres avec les associations de patients*

Colloque national sur le syndrome de Usher de type II, Rétina France et le CRESAM (Centre de Ressources Expérimental pour Enfants et Adultes Sourds-Aveugles et Sourds Malvoyants), Poitiers, 27 septembre 2003

« Syndrome de Usher »

Colloque national du BUCODES (Bureau de Coordination des Associations de Devenus Sourds et Malentendants), Paris, 15 mai 2004

« Les surdités héréditaires »

CHERCHEURS DU LABORATOIRE

Séminaires, conférences

Martine Cohen-Salmon

Séminaire, laboratoire de Jonathan Ashmore, Université de Londres, septembre 2003

« Towards the understanding of the gap junction role's in the inner ear »

Aziz El-Amraoui

Journée de l'Institut de Biologie, Collège de France, 23 septembre 2003

« Le syndrome de Usher (surdité et cécité chez l'homme) : des gènes à la physiopathologie »

Colloque de la Société de Biologie Cellulaire, *Biologie Cellulaire et Santé*, Marseille, 23 octobre 2003

« The Usher type I syndrome (deafness-blindness) : from causative genes to pathogenesis »

Journée Vision et Recherche Rétina-France, CHU Necker-Enfants Malades, 22 novembre 2003

« Syndrome de Usher : des gènes à la physiopathologie »

Département de Biologie Cellulaire et Infection, Institut Pasteur, 12 janvier 2004

« Surdité-cécité chez l'homme : dialogue entre la membrane et le cytosquelette pour bien s'entendre et se voir »

ARO (Association for Research in Otolaryngology) 27th Annual Midwinter Research Meeting, Daytona Beach, USA, 23 février 2004

« From deafness genes to molecular mechanisms underlying the cohesion of the hair bundle »

École Normale Supérieure de Lyon (Pierre Jurdic), 29 mars 2004

« Le syndrome de Usher (surdité-cécité chez l'homme) : une histoire d'adhésion, de trafic membranaire, et de cytosquelette »

Jean-Pierre Hardelin

Association Canaux Ioniques — 14^e colloque, Presqu' le de Giens, 21-24 septembre 2003

« Gap junction networks in the inner ear : What for ? »

Colloque de fin de programme ACI Interface Physique-Chimie-Biologie : Dynamique et Réactivité des Systèmes Biologiques, Dinard, 10 juin 2004

« Approche des propriétés physicochimiques et biologiques de molécules sous-tendant l'organisation et la dynamique de la touffe ciliaire »

Nadia Soussi-Yanicostas

Séminaire INSERM, Hôpital de la Salp triere, 30 octobre 2003

« L'anosmine-1, une molécule de guidage et de branchement axonal »

Séminaire,  cole Normale Supérieure, 17 novembre 2003

«  tude des fonctions de l'anosmine-1 et de son partenaire le FGFR1 au cours du développement du système olfactif »

ARO (Association for Research in Otolaryngology) *27th Annual Midwinter Research Meeting*, Daytona Beach, USA, 23 février 2004

Martine Cohen-Salmon, Vincent Michel, Jean-Pierre Hardelin, Francisco del Castillo

« Inactivation approaches to understand the gap junctions roles in the cochlea »

- Colloque du *d partement de Neurosciences*, Institut Pasteur, 13 février 2004

Martine Cohen-Salmon

« Towards the understanding of the gap junctions role in the cochlea »

Benjamin Delprat

« Molecular pathway underlying the growth of the stereocilia »

Aziz El-Amraoui, Rapha l Eournay

« Phret, a transmembrane protein, directly interacts with two adaptation motors, myosin 1c and myosin VIIa in the mechanosensory bundle »

Saaid Safieddine, Isabelle Roux

« Otoferlin, a C2 domain protein, as a starting point for the understanding of a synaptic vesicular trafficking in the cochlear sensory cells »

Enseignement**Aziz El-Amraoui**

DEA de Génétique Humaine : Université Pierre & Marie Curie (Paris 6) ; novembre 2003

« Comprendre les mécanismes des surdités héréditaires »

Jean-Pierre Hardelin

DES de Génétique Médicale : CHU Tours ; mars 2004

« Surdités héréditaires »

Nadia Soussi-Yanicostas

Cours organisé conjointement par l'Institut Pasteur et l'École Normale Supérieure, DEA de Neuropharmacologie (M. Dubois-Dalcq, Neurosciences, Institut Pasteur & A. Trembleau, Neurosciences, Université Paris VII) « *Développement et Plasticité du Système Nerveux* » ; octobre 2002

« Développement du système olfactif ; Guidage axonal » (Cours et Travaux pratiques) ; Syndrome de Kallmann

Diplômés

Nicolas Michalski, DEA Neurosciences, juin 2004, ED Cerveau, Cognition, Comportement, université Pierre & Marie Curie-Paris 6

« La touffe ciliaire, structure de réception du son : des gènes impliqués dans les surdités aux mécanismes qui sous-tendent son développement et son fonctionnement »

Ingrid Zwaenepoel, 17 décembre 2003, thèse de doctorat de l'université Denis-Diderot-Paris 7

« Approche moléculaire des surdités héréditaires et de la fonction auditive »

Chercheurs post-doctorants

Avital Adato, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israël

Francisco del Castillo, Unidad de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Espagne

Benjamin Delprat, INSERM U254, Neurobiologie de l'Audition, Montpellier

Vincent Michel, Laboratoire de Neurosciences, Université de Franche-Comté, Besançon

Amel El-Bahloul, Institut Curie, Paris

Gaëlle Lefèvre, INSERM U598, Institut Biomédical des Cordeliers, Paris

Collaborateurs cliniciens et biologistes de l'hôpital d'Enfants Armand Trousseau, Paris

Françoise Denoyelle, Professeur agrégé, chirurgien ORL

Sandrine Marlin, généticienne ORL

Delphine Feldmann, biochimiste

Hélène Blons, biologiste

Rémy Couderc, biochimiste

Natalie Loundon, biochimiste

Gilles Roger, praticien hospitalier, ORL

Eréa-Noël Garabédian, Professeur, ORL