

## **Génétique et physiologie cellulaire**

M<sup>me</sup> Christine PETIT, membre de l'Institut  
(Académie des Sciences), professeur

### **TRANSMISSION SYNAPTIQUE DANS LA COCHLÉE ET LA RÉTINE : « L'AFFAIRE DES RUBANS »**

Le terme synapse « à ruban » désigne un type particulier de synapse chimique dont la définition est morphologique. Cette synapse tire son qualificatif de la présence d'une structure osmiophile, dite corps ou ruban synaptique, associée à sa zone active, et à laquelle sont arrimées des vésicules synaptiques. Ultérieurement, on s'est aperçu qu'un ensemble de propriétés physiologiques la distingue aussi des synapses conventionnelles. Le cours a eu pour objectif de décrire les caractéristiques morpho-fonctionnelles de cette synapse et de discuter l'énigme qui entoure le rôle du ruban à travers une analyse critique des données bibliographiques. Ci-dessous, sont résumés quelques-uns des points discutés.

#### **Les caractéristiques morpho-fonctionnelles des synapses à ruban**

Chez les vertébrés, les synapses à ruban n'ont été observées que dans les systèmes sensoriels. Chez la drosophile, une densité présynaptique, dite « barre synaptique », se loge dans la jonction neuromusculaire (*T bar*). Des données récentes indiquent que cette synapse présente des similitudes fonctionnelles avec la synapse à ruban des vertébrés. Chez ces derniers, sont équipées de synapses à ruban, les cellules sensorielles de la rétine, qui répondent à la stimulation photonique (cônes et bâtonnets), les pinéalocytes de l'épiphyse, qui répondent à certaines stimulations mécaniques, les cellules sensorielles auditives, vestibulaires et de la ligne latérale des poissons et des larves des amphibiens (cellules ciliées), enfin les cellules sensorielles qui répondent au champ électrique (cellules ciliées des organes ampullaires et tubéreux de certains poissons). Les neurones bipolaires de la rétine, qui font relais avec les photorécepteurs, possèdent eux aussi des synapses à ruban. Cette présentation a fourni l'occasion d'une description du traitement du signal photonique dans la rétine.

Tandis que les synapses conventionnelles libèrent le neurotransmetteur en réponse à des potentiels d'action, dont la fréquence traduit la variation de l'intensité de la stimulation, les synapses à ruban, quant à elles, répondent à des variations graduelles du potentiel de membrane. Ce faisant, l'exocytose synaptique s'affranchit de deux contraintes liées à la réponse au potentiel d'action : 1) celle du seuil minimal de dépolarisation, qui doit être atteint pour obtenir un potentiel d'action, 2) celle de la fréquence maximale que peuvent atteindre les potentiels d'action, environ 300 Hz, en raison de l'existence d'une phase réfractaire. Les synapses à ruban se comportent comme des systèmes analogiques. La perte d'information sensorielle transmise aux synapses à ruban est bien moindre que dans les synapses conventionnelles. La fréquence maximale des signaux sinusoïdaux qui peuvent être transmis aux synapses à ruban est limitée par la constante de temps électrique de la membrane cellulaire. Pour la cellule ciliée interne de la cochlée, cette fréquence est d'environ 3 kHz. Enfin, la synapse de cette cellule a la particularité de fonctionner successivement sur deux modes. Au cours de sa différenciation, elle répond à des potentiels d'action calciques, puis, lorsqu'elle est mature, aux variations graduelles de son potentiel de membrane, dont l'amplitude est corrélée à l'intensité de la stimulation sonore.

Les synapses à ruban ont aussi une vitesse d'exocytose qui les classe parmi les synapses les plus rapides. Ainsi, dans la cellule auditive, 1 400 vésicules par seconde peuvent fusionner en chaque site actif, un chiffre à comparer avec celui de 7 à 20 vésicules en moyenne par zone active et par seconde dans les synapses conventionnelles. De plus, cette exocytose peut se maintenir inchangée pendant une stimulation prolongée. Un ensemble de résultats ont permis d'établir que la population des vésicules qui fusionnent le plus rapidement, dite RRP (*Readily Releasable Pool*), correspond dans les différentes synapses à ruban aux vésicules arrimées à la membrane présynaptique située sous le ruban. Sans que l'on sache s'il s'agit d'une caractéristique partagée par toutes les synapses à ruban, il est intéressant de noter qu'aussi bien dans les cellules ciliées internes de la cochlée que dans les neurones bipolaires de la rétine, la fusion intéresse plusieurs vésicules synaptiques simultanément. Dans les cellules ciliées internes, en moyenne 4 à 6 vésicules, et au maximum 22, fusionnent de façon coordonnée. Lorsque l'intensité de la stimulation sonore augmente, ni le nombre des vésicules qui fusionnent lors de chaque événement unitaire, ni leur cinétique de fusion ne varie. Seule la probabilité de survenue de ces événements unitaires, c'est-à-dire leur fréquence, se modifie. Cette propriété est à rapprocher de la précision temporelle du système sensoriel auditif, qui permet la discrimination fréquentielle et la localisation de la source sonore. En maintenant constante, quelle que soit l'intensité sonore, la quantité de neurotransmetteur libérée dans la fente synaptique lors de chaque dépolarisation, cette synapse s'affranchit de la diminution du délai synaptique qui accompagne toute augmentation de la quantité de neurotransmetteur libérée. Par conséquent, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  qui pénètrent dans la zone active après dépolarisation membranaire et ouverture des canaux calciques dépendant du poten-

tiel de membrane, changent la probabilité de survenue des événements de fusion sans en modifier les caractéristiques. Cette fusion multivésiculaire a été mise en évidence à un stade où les cellules ciliées internes ne sont pas complètement matures. Il reste donc à établir la persistance de ce processus à l'âge adulte. En ce qui concerne l'exocytose synaptique spontanée, les événements unitaires ont, semble-t-il, les mêmes caractéristiques que lors de l'exocytose induite par la dépolarisation.

Dans la recherche des fonctions du ruban, un nombre important d'études ont tenté d'établir d'éventuelles corrélations entre le nombre des rubans et les caractéristiques fonctionnelles des synapses. Ainsi, a été mis en évidence le fait que les cellules sensorielles auditives ont un nombre de rubans qui varie avec leur fréquence caractéristique : les cellules dont la fréquence caractéristique est élevée ont davantage de rubans. Des données éparses indiquent toutes que le nombre des rubans par cellule est en rapport avec le « volume » de l'information sensorielle traitée. Enfin, les variations physiologiques du nombre de rubans font l'objet d'une abondante littérature, car la mise en évidence d'un tel mode de régulation de l'activité synaptique devrait éclairer la fonction des rubans. Parce que ces données n'ont été obtenues, jusqu'à présent, que par analyse quantitative en microscopie électronique, seuls les changements très importants du nombre de rubans ont été bien établis. Ainsi, chez les poissons téléostéens, les rubans des photorécepteurs disparaissent presque totalement la nuit. Chez les mammifères, on manque de données reproductibles dans les photorécepteurs. De même, la variation observée du nombre de rubans des cellules vestibulaires en apesanteur demande à être confirmée. La modification des rubans des photorécepteurs chez les hibernants est en revanche bien établie. Chez les hibernants, les rubans des photorécepteurs flottent et leur taille diminue ; ils se reforment en 2 à 3 jours à la fin de l'hibernation. Il s'agit là, vraisemblablement, d'une régulation en rapport avec celle du métabolisme énergétique.

### **Fonctions hypothétiques des rubans synaptiques**

La liste des fonctions proposées pour les rubans synaptiques est longue : structure de réapprovisionnement continu de la synapse en vésicules synaptiques, de transport de ces vésicules vers la zone active, lieu de remplissage des vésicules synaptiques par le neurotransmetteur, lieu d'acquisition pour les vésicules synaptiques de l'état de compétence pour fusionner à la membrane plasmique, structure de reformation des vésicules synaptiques *in situ*, structure permettant l'éventuelle fusion homotypique des vésicules synaptiques, structure permettant la fusion multiple de vésicules avec la membrane plasmique, structure augmentant la probabilité des fusions vésiculaires, structure contrôlant la taille de la population vésiculaire qui va fusionner avec la membrane plasmique, nanomachine d'exocytose synaptique avec association des canaux calciques dépendant du potentiel de membrane et éventuellement de tampons du  $\text{Ca}^{2+}$ , structure de contrôle de la

tension des membranes destinées à fusionner, réservoir énergétique, structure douée de plasticité permettant une réponse synaptique adaptée aux besoins cellulaires... Ces différentes fonctions hypothétiques ne sont pas mutuellement exclusives.

### **Le cycle des vésicules synaptiques dans les synapses à ruban**

Plusieurs de ces propositions peuvent être évaluées par l'étude du cycle des vésicules synaptiques au niveau de ces synapses. Celle-ci a été menée en imagerie dynamique, par la technique TIRF (*total internal reflection fluorescence*). Un traceur fluorescent, le FM1-43, dont l'émission de fluorescence est sensible à l'environnement et qui s'intercale de façon réversible dans le feuillet interne des vésicules et se désorbe de la membrane lorsque l'exocytose l'expose au milieu aqueux extérieur, permet de suivre l'exocytose vésiculaire. Le neurone bipolaire de la rétine du poisson rouge se prête particulièrement bien à cette analyse en raison de la très grande taille de sa synapse, qui comporte près d'un million de vésicules synaptiques. Le cycle des vésicules synaptiques a également été étudié par microscopie confocale et avec la technique de FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*). Une méthode voisine a été utilisée dans les cônes d'une espèce particulière de lézard, le lézard anole, dont la rétine est exclusivement composée de cônes. Cette étude comportait d'ailleurs un grand nombre d'améliorations techniques : utilisation de l'AM1-43, qui permet en parallèle une étude en microscopie électronique, de l'Advasep-7 qui diminue le bruit de fond. Elle a conduit à des conclusions semblables à celles obtenues dans le neurone bipolaire de la rétine. Les vésicules synaptiques présentes dans ces terminaisons sont mobiles, contrairement aux vésicules synaptiques associées aux synapses conventionnelles. Même dans les régions de la synapse riches en filaments d'actine, la très grande majorité des vésicules synaptiques diffusent librement. Le traitement mathématique de ces données d'imagerie permet de conclure que la collision des vésicules synaptiques avec le ruban suffirait à rendre compte d'un réapprovisionnement continu des rubans en vésicules. À l'appui de cette diffusion libre, ni le  $\text{Ca}^{2+}$ , ni l'AMP cyclique, n'ont de rôle sur la mobilité de ces vésicules. Seul un rôle marginal des phosphorylations a été mis en évidence. La diffusion libre des vésicules synaptiques est à mettre en parallèle avec l'absence de synapsines dans les synapses à ruban. Les synapsines sont des phosphoprotéines qui, dans les synapses conventionnelles, sont associées aux vésicules synaptiques. Trois gènes codent les 5 isoformes répertoriées. Ces protéines se lient aux phospholipides des vésicules. Elles possèdent toutes, dans leur région N-terminale, un site de phosphorylation pour la protéine kinase A et la calmoduline kinase A, conservé dans l'évolution. Les synapsines phosphorylées se lient à l'actine. Les gènes qui codent les synapsines I et II ont été inactivés. Lorsque les synapsines I et II sont absentes, la libération du neurotransmetteur diminue dans les synapses conventionnelles. Les synapsines, en liant les vésicules synaptiques au cytosquelette d'actine dans les synapses conventionnelles, se comportent comme des régulateurs de la disponibilité de la population de vési-

cules synaptiques « de réserve ». Si l'absence de synapsine dans les cellules sensorielles du système acoustico-latéral suggère que les vésicules synaptiques y diffusent aussi librement, la preuve n'en a pas encore été apportée.

Les caractéristiques de l'endocytose paraissent très variables d'une synapse à ruban à l'autre. Les analyses par microscopie biphotonique, réalisées sur la cellule ciliée interne, indiquent que les vésicules synaptiques se formeraient pour l'essentiel à partir de l'endocytose apicale. Il semble que dans le saccule de grenouille, la re-formation des vésicules passe par celle de structures tubulaires intermédiaires, qui pourrait constituer, en cas de sur-stimulation sensorielle, une étape limitante du réapprovisionnement du ruban en vésicules.

### **La fusion membranaire de l'exocytose synaptique**

Nous nous sommes intéressés à l'étape finale du processus de fusion des vésicules avec la membrane présynaptique et à la signalisation calcique qui contrôle ce processus. Lors de la fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane présynaptique, une importante barrière énergétique doit être franchie car ces deux structures sont thermodynamiquement stables. Cette fusion, qui se fait dans un environnement aqueux, procède en deux étapes. Tout d'abord, les deux membranes doivent être rapprochées l'une de l'autre. La machinerie cellulaire doit surmonter les forces ioniques électrostatiques répulsives qui s'opposent à cette juxtaposition et dissiper l'hydratation qui existe entre ces deux membranes. Dans une deuxième étape, les liaisons qui unissent les groupements hydrophiles et hydrophobes de la bicouche lipidique sont déstabilisées ; la fusion progresse alors par des états intermédiaires gouvernés par des forces qui minimisent l'exposition des groupements non polaires à l'eau. Un pore se forme qui s'élargit. Nos connaissances actuelles des processus de fusion membranaire reposent sur les travaux pionniers effectués sur la fusion entre la membrane des virus et celle de la cellule hôte.

Le complexe SNARE (*soluble NSF attachment protein receptor*), complexe de fusion membranaire intracellulaire conservé à travers l'évolution, implique, comme celui qui médie la fusion des virus avec la membrane plasmique, la formation d'une tresse composée de 4 hélices extrêmement stables. La cristallisation du complexe SNARE, les expériences de fusion entre vésicules lipidiques artificielles porteuses des diverses protéines de ce complexe moléculaire, et l'inactivation des gènes qui codent chacune des 3 protéines du complexe, à savoir v-SNARE, dite VAMP (*vesicle associated membrane protein*) ou synaptobrévine et les deux t-SNARE (*target-SNARE*), syntaxine-1 et SNAP-25 (*25 kDa synaptosome-associated protein*), ont permis d'établir le rôle essentiel de ce complexe moléculaire dans la fusion membranaire synaptique. Pourtant, des données indiquent que le complexe SNARE ne peut rendre compte à lui seul de toute l'activité fusogène associée à l'exocytose synaptique. Après la présentation des protéines SNARE (incluant la définition du motif SNARE, motif de 60 à 70 acides aminés

composé de 8 répétitions heptamériques, et les études de la formation du complexe moléculaire), le cours s'est concentré sur la régulation calcique de cette fusion membranaire dans les synapses conventionnelles, puis dans les synapses à ruban.

La dépendance calcique de la fusion vésiculaire avec la membrane présynaptique a été analysée finement grâce à des travaux qui associent photolyse calcique et enregistrements électrophysiologiques postsynaptiques. La vitesse de fusion des vésicules et l'intensité des courants de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire sont liées par une relation  $y = x^n$  dans laquelle  $n$  représente la coopérativité de sites de liaison aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le complexe moléculaire fusogène. Les données expérimentales récentes peuvent être interprétées dans le cadre d'un modèle allostérique de type Monod-Wyman-Changeux. Ce modèle peut en effet rendre compte, d'une part de la diminution de la coopérativité aux faibles concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$ , et d'autre part de l'exocytose spontanée en absence de  $\text{Ca}^{2+}$ . Un ensemble d'arguments expérimentaux confère aujourd'hui à la synaptotagmine 1 (Syt1), un rôle de « senseur calcique » (détecteur-effecteur) majeur dans l'exocytose synaptique. Les synaptotagmines sont des protéines vésiculaires transmembranaires composées de deux domaines C2 de topologie I, qui lient le  $\text{Ca}^{2+}$  (au total cinq ions  $\text{Ca}^{2+}$  pour la synaptotagmine 1). Chacun des deux domaines C2A et C2B de la synaptotagmine 1 a une faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . La synaptotagmine 1 exerce son activité grâce à sa liaison très affine à la phosphatidylsérine des membranes, en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ . Les expériences qui fondent le rôle de la synaptotagmine 1 dans l'exocytose synaptique sont l'inactivation du gène correspondant (souris *Syt1<sup>-/-</sup>*), réalisée en 1994, qui supprime l'exocytose dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  sans modifier l'exocytose synaptique spontanée, et celle induite par un choc hypertonique. Mieux, la preuve a été apportée *in vivo* que le changement d'un acide aminé dans le domaine C2A, la substitution par une glutamine de l'arginine située en position 233 (R233Q), immédiatement adjacente à un acide aminé qui lie le  $\text{Ca}^{2+}$ , modifie l'exocytose synaptique induite par le  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette mutation, qui diminue l'affinité de ce domaine pour le  $\text{Ca}^{2+}$  mesurée *in vitro*, diminue l'amplitude de l'exocytose en fonction de la concentration calcique *in vivo*. Enfin, des mutations entraînant une augmentation d'affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  du domaine C2A ou du domaine C2B, par la substitution aux mêmes emplacements dans chacun de ces domaines de trois résidus hydrophobes par trois tryptophanes, induisent, après transfection dans des cellules chromaffines dérivées de souris *Syt1<sup>-/-</sup>*, une augmentation de l'amplitude de leur exocytose synaptique induite par le  $\text{Ca}^{2+}$ . La modification de la cinétique d'ouverture et de fermeture du pore de fusion lorsque la synaptotagmine 1 est surexprimée, indique que la synaptotagmine 1 est sans doute impliquée très directement dans le processus fusogène. Comment agit la synaptotagmine 1 dans l'étape finale de l'exocytose ? Des analyses biochimiques ainsi que des expériences de fusion de vésicules lipidiques artificielles ont permis de mettre en évidence des interactions entre la synaptotagmine 1 et les composants du complexe SNARE. Une controverse demeure cependant sur ces interactions, et tout particulièrement sur leur régulation par le  $\text{Ca}^{2+}$ .

Une analyse approfondie de la liaison du domaine C2B de la synaptotagmine 1 à la phosphatidylsérine en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  a montré qu'intervenait dans cette interaction, non seulement la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  aux charges négatives de la phosphatidylsérine, mais également celle d'un ensemble de résidus basiques présents à la surface du domaine C2B. L'analyse du rôle de ces résidus a été effectuée en leur substituant des cystéines, dont la réactivité au NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole) provoque une augmentation de l'émission de fluorescence lors de leur passage d'un environnement hydrophile à un environnement hydrophobe. La multivalence de la liaison du domaine C2B à la phosphatidylsérine permet à ce domaine de lier un beaucoup plus grand nombre de phosphatidylsérines que le domaine C2A. Il s'en suit que ce domaine, contrairement au domaine C2A, peut induire *in vitro* la juxtaposition de deux membranes. Leur distance, ainsi réduite à 4 nm, permet alors la fusion membranaire. Par ailleurs, cette multivalence de liaison conférerait à ce domaine la possibilité d'agir sur le pore de fusion en induisant une courbure des membranes.

L'exocytose synaptique continue des synapses à ruban et leur réponse permanente aux variations graduelles du potentiel de membrane impliquent, quant à elles, la présence au niveau synaptique de canaux calciques différents des canaux de type N et Q qui équipent les synapses conventionnelles. De fait, les canaux calciques des synapses à ruban sont de type L. Ils sont très peu sensibles à l'inactivation par le  $\text{Ca}^{2+}$ , et s'activent et se désactivent rapidement lors des variations du potentiel de membrane. Dans les cellules sensorielles auditives du poulet, la sous-unité  $\alpha$ -1D qui les compose présente des spécificités dues à trois épissages alternatifs particuliers. L'inactivation de la sous-unité  $\alpha$ 1-D a été réalisée chez la souris. Les souris  $\alpha$ 1-D<sup>-/-</sup> sont totalement sourdes et n'ont plus d'exocytose synaptique. En revanche, fait surprenant, la fonction vestibulaire paraît normale chez ces souris. Enfin, il convient de rappeler que dans les cellules sensorielles auditives de la tortue et du poulet, ce canal joue un rôle supplémentaire, comme nous l'avons vu dans le cours de l'année 2003. Avec les canaux potassiques dépendants du  $\text{Ca}^{2+}$ , canaux BK, il crée en effet un circuit électrique oscillant à l'origine de la résonance électrique qui caractérise le fonctionnement des cellules sensorielles auditives dans ces espèces. Les différentes isoformes du canal potassique dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  qui s'expriment le long de l'axe tonotopique de l'organe sensoriel, confèrent aux différentes cellules une fréquence d'oscillation distincte.

La relation exocytose (mesurée par les variations de capacitance) en fonction de l'intensité des courants calciques a été étudiée dans les photorécepteurs (les bâtonnets), les neurones bipolaires de la rétine et les cellules ciliées internes de la cochlée de souris. Les courbes obtenues indiquent une absence de coopérativité, une relation linéaire entre ces deux variables. Le seuil d'apparition de l'exocytose en fonction de la concentration calcique paraît très différent d'un type de synapse à ruban à l'autre : bas pour les photorécepteurs (750 nM), élevé dans les neurones bipolaires (8 à 10  $\mu\text{M}$ ) et dans les cellules ciliées internes

(7  $\mu\text{M}$ ). Dans les cellules ciliées internes, la synapse, dont l'activité a débuté au 18<sup>e</sup> jour embryonnaire, devient mature entre le 10<sup>e</sup> et le 15<sup>e</sup> jour après la naissance. Ce faisant, on observe une baisse de l'intensité des courants calciques, qui semble être en rapport avec une baisse du nombre des canaux calciques présents dans ces cellules. C'est le moment où la synapse, qui répondait à des potentiels d'action, commence à répondre à des variations graduelles du potentiel de membrane. En parallèle, la courbe « exocytose synaptique en fonction de l'intensité des courants calciques », se modifie : d'exponentielle durant le développement, elle devient linéaire au stade adulte. Ce changement porte à la fois sur le RRP et la population de vésicules qui fusionnent plus lentement. Toutefois, dans la cellule ciliée interne mature, lors d'expériences de photolyse calcique conduisant à une élévation très importante du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et à une exocytose massive (100 fois le RRP, et de nature inconnue), c'est une relation non linéaire qui a été décrite entre exocytose et concentration calcique. La même observation a été faite dans les photorécepteurs. C'est peut-être dans la structuration en nano-domaines de la synapse que se tient l'explication de la différence de la relation entre exocytose et concentration calcique décelée entre ces deux situations expérimentales. Dans ces nanodomains, les concentrations locales de  $\text{Ca}^{2+}$  seraient élevées au potentiel de repos de la cellule, de sorte qu'une très faible variation de cette concentration lors d'une dépolarisation suffirait à déclencher l'exocytose synaptique. L'intérêt physiologique d'une réponse coopérative lorsqu'une synapse répond à des potentiels d'action, et d'une réponse linéaire lorsqu'elle répond à des variations graduelles du potentiel de membrane, a été discuté.

Le séminaire intitulé « *Ribbon synapses : physiology, molecular dynamics* » a permis d'approfondir certains aspects du cours.

#### QUELQUES ÉLÉMENTS BIBLIOGRAPHIQUES

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

### 1. Ruban synaptique et transfert de l'information sensorielle

(cours 30 mars)

Hama K. & Saito K. (1977) Fine structure of the afferent synapse of the hair cells in the saccular macula of the goldfish, with special reference to the anastomosing tubules. *J. Neurocytol.*, 6, 361-73.

Lagnado L. (2005) Ribbon synapses : anchors away for a fishy tale. *Curr. Biol.*, 15, R102-5.

Lenzi D. & von Gersdorff H. (2001) Structure suggests function : the case for synaptic ribbons as exocytotic nanomachines. *Bioessays*, 23, 831-40.

Parsons T.D. & Sterling P. (2003) Synaptic ribbon. Conveyor belt or safety belt ? *Neuron*, 37, 379-82.



Sterling P. & Matthews G. (2005) Structure and function of ribbon synapses. *Trends Neurosci.*, 28, 20-9.

von Gersdorff H. (2001) Synaptic ribbons : versatile signal transducers. *Neuron*, 29, 7-10.

## **2. Rôle des rubans : formation, trafic, fusion des vésicules synaptiques...**

(cours 6 avril)

Fuchs P.A. (2005) Time and intensity coding at the hair cell's ribbon synapse. *J. Physiol.*, 566, 7-12.

Fuchs P.A., Glowatzki E. & Moser T. (2003) The afferent synapse of cochlear hair cells. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 13, 452-8.

Glowatzki E. & Fuchs P.A. (2002) Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat. Neurosci.*, 5, 147-54.

Neves G. & Lagnado L. (1999b) The retina. *Curr. Biol.*, 9, R674-7.

Parsons T.D., Lenzi D., Almers W. & Roberts W.M. (1994) Calcium-triggered exocytosis and endocytosis in an isolated presynaptic cell : capacitance measurements in saccular hair cells. *Neuron*, 13, 875-83.

Rutherford M.A. & Roberts W.M. (2006) Frequency selectivity of synaptic exocytosis in frog saccular hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 2898-903.

von Gersdorff H., Vardi E., Matthews G. & Sterling P. (1996) Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released. *Neuron*, 16, 1221-7.

## **3. Physiologie moléculaire comparative des synapses à rubans et des synapses conventionnelles (1)** (cours 4 mai)

Griesinger C.B., Richards C.D. & Ashmore J.F. (2002) Fm1-43 reveals membrane recycling in adult inner hair cells of the mammalian cochlea. *J. Neurosci.*, 22, 3939-52.

Griesinger C.B., Richards C.D. & Ashmore J.F. (2005) Fast vesicle replenishment allows indefatigable signalling at the first auditory synapse. *Nature*, 435, 212-5.

Holt M., Cooke A., Neef A. & Lagnado L. (2004) High mobility of vesicles supports continuous exocytosis at a ribbon synapse. *Curr. Biol.*, 14, 173-83.

Lenzi D., Runyeon J.W., Crum J., Ellisman M.H. & Roberts W.M. (1999) Synaptic vesicle populations in saccular hair cells reconstructed by electron tomography. *J. Neurosci.*, 19, 119-32.

Lenzi D., Crum J., Ellisman M.H. & Roberts W.M. (2002) Depolarization redistributes synaptic membrane and creates a gradient of vesicles on the synaptic body at a ribbon synapse. *Neuron*, 36, 649-59.

Rea R., Li J., Dharia A., Levitan E.S., Sterling P. & Kramer R.H. (2004) Streamlined synaptic vesicle cycle in cone photoreceptor terminals. *Neuron*, 41, 755-66.

Zenisek D., Davila V., Wan L. & Almers W. (2003) Imaging calcium entry sites and ribbon structures in two presynaptic cells. *J. Neurosci.*, 23, 2538-48.

Zenisek D., Horst N.K., Merrifield C., Sterling P. & Matthews G. (2004) Visualizing synaptic ribbons in the living cell. *J. Neurosci.*, 24, 9752-9.

#### **4. Physiologie moléculaire comparative des synapses à rubans et des synapses conventionnelles (2) (cours 11 mai)**

Arac D., Chen X., Khant H.A., Ubach J., Ludtke S.J., Kikkawa M., Johnson A.E., Chiu W., Sudhof T.C. & Rizo J. (2006) Close membrane-membrane proximity induced by Ca(2+)-dependent multivalent binding of synaptotagmin-1 to phospholipids. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13(3), 209-17.

Beutner D., Voets T., Neher E. & Moser T. (2001) Calcium dependence of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse. *Neuron*, 29, 681-90.

Bhalla A., Chicka M.C., Tucker W.C. & Chapman E.R. (2006) Ca<sup>2+</sup>-synaptotagmin directly regulates t-SNARE function during reconstituted membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13(4), 323-30.

Chapman E.R. (2002) Synaptotagmin : a Ca<sup>2+</sup> sensor that triggers exocytosis ? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 3, 498-508.

Hille B. (2001) Ion Channels of Excitable Membranes, Third edn : (Sinauer Ass. Inc.).

Issa N. & Hudspeth A. (1994) Clustering of Ca<sup>2+</sup> channels and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels at fluorescently labeled presynaptic active zones of hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91, 7578-82.

Johnson S.L., Marcotti W. & Kros C.J. (2005) Increase in efficiency and reduction in Ca<sup>2+</sup> dependence of exocytosis during development of mouse inner hair cells. *J. Physiol.*, 563, 177-91.

Khimich D., Nouvian R., Pujol R., Tom Dieck S., Egnér A., Gundelfinger E.D. & Moser T. (2005) Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature*, 434, 889-94.

Lou X., Scheuss V. & Schneggenburger R. (2005) Allosteric modulation of the presynaptic Ca<sup>2+</sup> sensor for vesicle fusion. *Nature*, 435, 497-501.

Moser T. & Beutner D. (2000) Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 883-8.

Rhee J.S., Li L.Y., Shin O.H., Rah J.C., Rizo J., Sudhof T.C. & Rosenmund C. (2005) Augmenting neurotransmitter release by enhancing the apparent Ca<sup>2+</sup> affinity of synaptotagmin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 18664-9.

Schmitz F., Konigstorfer A. & Sudhof T.C. (2000) Ribeye, a component of synaptic ribbons : a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron*, 28, 857-72.

Thoreson W.B., Rabl K., Townes-Anderson E. & Heidelberger R. (2004) A highly Ca<sup>2+</sup>-sensitive pool of vesicles contributes to linearity at the rod photoreceptor ribbon synapse. *Neuron*, 42, 595-605.

Zimmerberg J., Akimov S.A. & Frolov V. (2006) Synaptotagmin : fusogenic role for calcium sensor ? *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13, 301-03.

#### ACTIVITÉ DE RECHERCHE DU LABORATOIRE (2005-2006)

Les avancées les plus significatives réalisées au cours de l'année 2005-2006 ont porté d'une part sur les neuropathies auditives héréditaires, et d'autre part sur la physiologie et la physiopathologie moléculaires de la cellule sensorielle auditive. La physiopathologie de la surdité liée à l'atteinte de la connexine 30 a elle aussi progressé.

### **I. NEUROPATHIES AUDITIVES HÉRÉDITAIRES : GÈNES, PHYSIOPATHOLOGIE ET PHYSIOLOGIE MOLÉCULAIRES, IMPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES**

Les neuropathies auditives sont les seules atteintes auditives qui soient cliniquement distinguables des autres surdités. Elles sont définies comme des surdités de perception dans lesquelles les otoémissions acoustiques persistent. Ces dernières traduisent l'activité des cellules ciliées externes, qui jouent le rôle d'amplificateurs cochléaires. En raison de leur similarité avec les cellules ciliées internes, seules véritables cellules sensorielles puisqu'elles seules codent la stimulation sonore en influx nerveux, s'est progressivement installée l'idée que les cellules ciliées internes étaient elles aussi fonctionnelles dans ces neuropathies, et que par conséquent, l'atteinte avait sans doute pour cible les voies auditives au-delà de la cochlée.

#### **I.1. Un gène dont l'atteinte est à l'origine de la surdité isolée DFNB59 et se traduit par un dysfonctionnement des voies auditives centrales**

(Sedigheh Delmaghani, Francisco Del Castillo, Michel Leibovici, Vincent Michel, Dominique Weil, Christine Petit ; en collaboration avec Paul Avan, Clermont-Ferrand)

Dans deux familles atteintes d'une surdité neurosensorielle congénitale, sévère pour l'une, profonde pour l'autre, de transmission autosomique récessive, DFNB59, nous avons décelé deux mutations faux-sens différentes (T54I et R183W) dans un gène qui code une nouvelle protéine, que nous avons appelée « pejvakine »

(écho, en persan). Cette protéine de 352 acides aminés présente dans sa moitié N-terminale 54 % de similarité avec une protéine (de fonction elle aussi inconnue) défectueuse dans une autre surdité, DFNA5. Afin de valider l'implication de la pejkakine dans la surdité humaine, la mutation R183W a été introduite par recombinaison homologue chez la souris (souris *Dfnb59<sup>tm1Ugds/tm1Ugds</sup>*). Les souris mutantes obtenues présentent bien une surdité, ce qui valide le gène qui code la pejkakine comme responsable de la surdité DFNB59. Toutefois, la perte auditive ne porte que sur les fréquences aiguës et est de gravité modérée. L'exploration de la fonction auditive des souris *Dfnb59<sup>tm1Ugds/tm1Ugds</sup>* a mis en évidence une surdité qui répond à la définition d'une neuropathie auditive. De plus, l'étude de leurs potentiels évoqués auditifs a révélé l'existence d'un retard et d'une désynchronisation des réponses électriques le long des voies auditives, au moins jusqu'au colliculus inférieur. Un examen plus approfondi de l'audition dans les deux familles malentendantes a alors permis de conclure que les individus atteints présentaient bien une neuropathie auditive ; les otoémissions acoustiques étaient bien présentes, y compris chez les personnes sourdes profondes. Chez eux aussi, on observait une désynchronisation des potentiels évoqués acoustiques. Des enregistrements électriques réalisés chez la souris *Dfnb59<sup>tm1Ugds/tm1Ugds</sup>* ont permis de déceler le maintien de la réponse électrique des cellules ciliées internes. Enfin, par immunomarquage, la présence de la pejkakine a été détectée dans les neurones du ganglion spiral et dans certains neurones des noyaux cochléaires, de l'olive supérieure et du colliculus inférieur. Le gène qui code la pejkakine est le premier gène identifié dont l'atteinte conduit à une surdité qui n'est pas due à une atteinte cochléaire, mais porte sur les neurones de la voie afférente. La précision temporelle étant la caractéristique majeure du codage de l'information auditive, retard et désynchronisation de la propagation de l'influx nerveux altèrent sans aucun doute la reconnaissance de certains messages sonores. Il reste à découvrir les mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels la pejkakine est impliquée dans le seuil de la réponse auditive et sa synchronisation.

**I.2. L'otoferline, défectueuse dans la surdité DFNB9, est indispensable à l'exocytose synaptique des cellules sensorielles auditives** (Isabelle Roux, Saaid Safieddine, Amel Bahloul, Christine Petit ; en collaboration avec Paul Avan, Clermont-Ferrand, Régis Novvian & Tobias Moser, Göttingen)

Nous avons identifié il y a quelques années le gène responsable de la neuropathie auditive héréditaire de transmission autosomique récessive DFNB9. DFNB9 représente la 3<sup>e</sup> cause de surdité sévère ou profonde en Espagne, après la surdité liée à l'atteinte de la connexine-26 et les surdités d'origine mitochondriale. Ce gène code pour une protéine de la famille des ferlines, l'otoferline. Deux des trois autres membres de cette famille présents chez les mammifères, la dysferline et la myoferline, sont défectueux dans des myopathies héréditaires. Dysferline et myoferline jouent toutes deux un rôle dans des processus de réparation membra-

naire. Des données préliminaires suggéraient que l'otoférline était un composant de la synapse des cellules ciliées internes, une synapse aux propriétés physiologiques très particulières (voir résumé du cours) et que sous-tendent des mécanismes moléculaires encore inconnus.

Par immunodétection en microscopie optique, nous avons observé que la présence de l'otoférline dans les cellules ciliées auditives est strictement corrélée avec leur synaptogenèse, puis par microscopie électronique, que l'otoférline est un composant des vésicules synaptiques. Prenant en compte le fait que la synaptotagmine-1, que l'on s'accorde à considérer comme le « senseur » calcique des synapses conventionnelles, est indétectable dans les cellules ciliées internes, tout comme la synaptotagmine-2, nous avons émis l'hypothèse que l'otoférline pourrait remplacer ces deux protéines manquantes. De fait, nous avons montré que l'otoférline lie le  $\text{Ca}^{2+}$ , au moins par son domaine C2D. Comme la synaptotagmine-1, l'otoférline interagit directement *in vitro* avec la syntaxine-1 et SNAP25, deux protéines du complexe SNARE (voir résumé du cours), d'une manière dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ . Afin de définir le rôle de l'otoférline *in vivo*, nous avons généré un modèle murin de la surdité DFNB9, en délétant les exons 14 et 15 de ce gène par recombinaison homologue chez la souris. Les souris *Otof*<sup>-/-</sup> obtenues ont une perte auditive qui excède 100 dB. L'architecture de leur organe de Corti est normale. La morphogenèse de la synapse des cellules ciliées internes, examinée au microscope électronique, l'est aussi : les rubans synaptiques sont ancrés à la membrane plasmique, la forme et le nombre de vésicules synaptiques qui leur sont associées, ne sont pas modifiés. Toutefois, à partir du 6<sup>e</sup> jour postnatal, l'ultrastructure de la synapse s'altère progressivement. L'étude électrophysiologique des cellules ciliées internes a montré que la dépolarisation n'induit aucune augmentation de capacitance de ces cellules, établissant ainsi l'absence de toute exocytose synaptique dans ces conditions. Les courants calciques sont cependant normaux. L'élévation de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par photolyse calcique ne parvient pas à restaurer l'exocytose rapide et ne restaure que très partiellement sa composante lente. Ces données fonctionnelles obtenues alors que les vésicules synaptiques étaient bien arrimées à la membrane présynaptique, indiquent que l'otoférline est indispensable à la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane présynaptique et qu'elle agit après l'étape d'arrimage des vésicules. On ignore encore si elle intervient dans l'étape d'acquisition de la compétence à fusionner (*priming*) ou dans la fusion membranaire elle-même.

Ainsi, la surdité DFNB9 résulte d'une atteinte d'origine cochléaire, celle des cellules ciliées internes. En revanche, la surdité DFNB59, au moins en ce qui concerne la mutation étudiée, résulte de l'atteinte des neurones de la voie afférente. Les indications de l'implant cochléaire dans les neuropathies auditives sont très controversées et les résultats contrastés, ce qu'explique en partie la différence de cible cellulaire primitive dans les diverses formes de neuropathie auditive, révélée par l'étude de DFNB9 et de DFNB59. La clarification de la pathogénie

de la surdité DFNB9 permet de prédire que l'implant cochléaire, parce qu'il stimule directement le nerf auditif épargné par la lésion primitive, sera efficace dans cette forme de surdité. De fait, on sait qu'il l'est. En revanche, l'intérêt de l'implant cochléaire est incertain pour la surdité DFNB59. Le diagnostic moléculaire des neuropathies auditives pratiqué chez des patients implantés, pourrait permettre de répondre prochainement à cette interrogation. Ainsi, on s'achemine, par la connaissance des différentes formes de neuropathies héréditaires et de leur pathogénie, vers un démembrement en entités nosologiques pour lesquelles l'indication ou non de l'implant cochléaire sera connue.

## II. PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE MOLÉCULAIRES DE LA CELLULE SENSORIELLE AUDITIVE

### II.1. Touffe ciliaire : structure de réception du son

La touffe ciliaire, structure de réception du son, est composée de microvillosités rigides, les stéréocils, auxquels est associé durant leur développement un cil primaire, le kinocil. Soumise à la stimulation de l'onde sonore, la touffe ciliaire se défléchit en pivotant à sa base, en un seul bloc. Les stéréocils sont unis par un lien apical (*tip link*), dont la direction est celle de la stimulation qui est opérante sur la touffe ciliaire. La mise sous tension du lien apical par la stimulation sensorielle provoque l'ouverture du canal de transduction mécano-électrique. Par ailleurs, de nombreux liens latéraux unissent les stéréocils à l'intérieur d'une même rangée et d'une rangée à l'autre, ainsi qu'au kinocil. On ignore encore les fonctions de ces liens.

#### II.1.a. Fonctions des liens de la touffe ciliaire : physiopathologie moléculaire du syndrome de Usher de type I et de type II

(Gaelle Lefèvre, Nicolas Michalski, Vincent Michel, Raphaël Etournay, Avital Adato, Dominique Weil, Christine Petit)

L'identification des gènes impliqués dans le syndrome de Usher (USH) et l'étude de la fonction des protéines qu'ils codent ont fourni un ensemble d'informations sur ces liens, et ce faisant sur la pathogénie des atteintes auditives correspondantes. Le syndrome de Usher de type I (USH1) se caractérise par une surdité profonde et un dysfonctionnement vestibulaire congénitaux, associés à une rétinopathie pigmentaire d'apparition prépubertaire. Cinq gènes (*USH1-B*, *-C*, *-D*, *-F* et *-G*) ont été identifiés, qui codent respectivement une myosine non conventionnelle, la myosine VIIa, une protéine à domaines PDZ, l'harmonine, deux cadhérines pourvues d'un domaine extracellulaire particulièrement long, la cadhérine 23 et la protocadhérine 15, enfin une protéine à domaine ankyrine, Sans. Des travaux antérieurs, provenant essentiellement de notre laboratoire, ont mis en évidence le fait que les cinq protéines USH1 peuvent interagir *in vitro* et que la cadhérine 23 forme des liens latéraux entre les stéréocils dès le début

de leur croissance. Tout indique que la protocadhérine 15 forme, elle aussi, de tels liens. Ainsi nos travaux ont-ils révélé l'existence de liens latéraux précoces passés inaperçus. Au cours de cette année, nous avons entrepris une étude systématique de mutants de souris défectueux pour l'un ou l'autre des 5 gènes USH1, ainsi que l'analyse du profil d'expression spatio-temporel de chacune des protéines USH1. Après avoir invalidé le gène qui code l'harmonine, nous avons constaté que chez ces mutants (souris *Hmn*<sup>-/-</sup>), la touffe ciliaire se fragmente très précocement. La perte de cohésion de la touffe ciliaire est observée dès le 18<sup>e</sup> jour embryonnaire. Il semble qu'une fragmentation semblable de la touffe ciliaire existe chez les mutants défectueux pour chacun des 4 autres gènes USH1. De plus, chez les mutants *Hmn*<sup>-/-</sup>, on observe une délocalisation du kinocilium. Cette anomalie évoque des troubles de polarité planaire, qui sont aussi observés chez tous les autres mutants USH1 ; ils sont cependant plus marqués chez les mutants défectueux pour la cadhérine 23 et la protocadhérine 15. L'harmonine, qui interagit avec la région intracytoplasmique des deux cadhérines *in vitro* et se colocalise avec elles dans les stéréocils, ne paraît pas conditionner l'adressage de ces deux protéines au sommet des stéréocils en croissance. En revanche, il est à noter que nous avons observé l'harmonine précisément au point d'ancrage du *tip link*, à partir du 5<sup>e</sup> jour après la naissance. L'enregistrement des courants de transduction mécano-électrique chez la souris *Hmn*<sup>-/-</sup> montre que leur amplitude est très réduite et que la tension qui s'exerce sur le canal est très variable. L'ensemble des résultats suggère donc que l'harmonine n'est nécessaire à l'ancrage d'aucun des liens stéréociliaires connus mais pourrait en moduler la tension, expliquant ainsi, en cas d'absence de cette protéine, la rupture de la cohésion de la touffe ciliaire à un stade précoce.

Le syndrome de Usher de type II se distingue du type I par une surdité de sévérité moindre et l'absence de trouble vestibulaire. Deux gènes responsables des formes USH2A et USH2C ont été identifiés. Ils codent tous deux pour des protéines dont certaines isoformes sont transmembranaires. Compte tenu de leur très grand domaine extracellulaire et de leur profil spatio-temporel d'expression, nous avons considéré qu'elles pourraient elles aussi entrer dans la composition de certains liens particuliers de la touffe ciliaire, qui unissent la base des stéréocils jusqu'à ce que la touffe ciliaire soit entièrement mature. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'usherine, codée par *USH2A*. Nous avons montré qu'*in vitro*, la région intracytoplasmique de l'usherine interagit avec l'harmonine et la whirline. La whirline est une protéine du stéréocil qui, comme l'harmonine, comporte des domaines PDZ, et qui est défectueuse dans une forme de surdité isolée. La composition de la région extracellulaire de l'usherine avec sa vingtaine de domaines de type III de la fibronectine dits « absorbeurs de chocs » car ils peuvent de façon réversible, en raison de l'absence de ponts disulfures internes, perdre leur structure sous l'effet de forces mécaniques et la retrouver lorsqu'elles cessent de s'appliquer, nous a conduit à proposer l'hypothèse selon laquelle ces liens pourraient avoir un comportement comparable à celui d'un ressort.

**II.1.b. Mise en évidence d'une coiffe de matériel acellulaire au sommet de la touffe ciliaire des cellules ciliées externes : physiopathologie de la surdité DFNB16 liée à l'atteinte de la stéréociline**

(Élisabeth Verpy, Christine Petit, en collaboration avec Guy Richardson, Brighton)

Nous avons identifié le gène *STRC* comme responsable de la surdité isolée récessive DFNB16, une surdité modérée dans les fréquences basses et sévère dans les fréquences hautes. Ce gène code pour une nouvelle protéine que nous avons appelée stéréociline. L'étude de la stéréociline nous a permis de découvrir l'existence d'une substance amorphe qui coiffe la touffe ciliaire des cellules ciliées externes. La rangée de stéréocils la plus haute de ces cellules s'ancrage dans la membrane tectoriale, une structure acellulaire gélatineuse, dont le déplacement relatif par rapport à celui du corps cellulaire des cellules ciliées externes, lors de la stimulation sonore, défléchit la touffe ciliaire de ces cellules, ouvrant ainsi leurs canaux de transduction mécano-électrique... Les souris dont nous avons inactivé le gène qui code la stéréociline (souris *Strc*<sup>-/-</sup>) présentent une perte auditive tout à fait semblable à celle des individus affectés par la surdité DFNB16. La coiffe sus-décrite est absente. La membrane tectoriale ne porte pas l'empreinte du sommet des stéréocils les plus hauts des cellules ciliées externes, démontrant ainsi que la stéréociline est indispensable à l'ancrage de ces stéréocils dans la membrane tectoriale. Par ailleurs, alors que l'organisation de la touffe ciliaire de ces cellules, ainsi que la transduction mécano-électrique sont totalement normales jusqu'au 8<sup>e</sup> jour après la naissance, la touffe ciliaire perd sa cohésion brusquement au 10<sup>e</sup> jour. La touffe ciliaire ne se fragmente pas, mais les stéréocils deviennent indépendants les uns des autres. Aucun lien interstéréociliaire ne persiste. Or cette anomalie survient précisément à la date à laquelle se met en place l'électromotilité des cellules ciliées externes, qui leur confère leur rôle d'amplificateur cochléaire (voir ci-dessous). Nous proposons donc que cette coiffe protège la touffe ciliaire des cellules ciliées externes du stress mécanique produit par les cycles de contraction/décontraction de leur corps cellulaire, que rythment les variations de leur potentiel de membrane induites par la stimulation sonore. À l'appui de cette hypothèse, les mutations du gène qui code l' $\alpha$ -tectorine, l'un des composants de la membrane tectoriale, ne permettent pas l'ancrage des stéréocils des cellules ciliées externes, mais la touffe ciliaire n'est pas affectée, ce qui indique que la perte de l'ancrage en l'absence de stéréociline ne peut être la cause de la perte de cohésion des stéréocils. Les caractéristiques biochimiques et biophysiques de cette coiffe, qui semble d'autant plus développée que la cellule sensorielle répond à des fréquences plus élevées, ainsi que celle des molécules nécessaires à son ancrage aux stéréocils et à la membrane tectoriale seront particulièrement intéressantes à élucider. Enfin, le corollaire de l'hypothèse proposée est que les liens interstéréociliaires de la cellule ciliée externe sont incapables à eux seuls de maintenir la cohésion des stéréocils dans cette cellule.



Enfin, au plan clinique, nous pouvons conclure que cette forme de surdité (DFNB16) est due à l'atteinte sélective des cellules ciliées externes.

## II.2. Bases moléculaires de l'électromotilité des cellules ciliées externes

(Aziz El-Amraoui, Kirian Legendre, Christine Petit)

Les cellules ciliées externes, qui n'existent que chez les mammifères, réagissent mécaniquement à la dépolarisation-repolarisation électrique induite par la stimulation sonore, par un cycle de contraction-décontraction de leur paroi entraînant un changement de leur taille. Ce phénomène, appelé électromotilité, permet aux cellules ciliées externes de jouer un rôle d'amplificateur de la stimulation sonore et de contribuer de façon très importante à la sélectivité de l'analyse fréquentielle cochléaire. La paroi latérale des cellules ciliées externes est dotée d'un dense réseau de cytosquelette sous-cortical (*cortical lattice*) hautement organisé, qui lui confère sa forme cylindrique unique. On ignore comment ce réseau se met en place et se maintient dans les différents états fonctionnels de la cellule, et comment il est lié à la prestine, la protéine effectrice de l'électromotilité.

Un crible double hybride effectué avec la queue de la myosine VIIa comme appât nous a permis d'identifier une spectrine, la  $\beta$ V-spectrine. La  $\beta$ V-spectrine humaine contient un domaine de liaison à l'actine, 29 répétitions spectrine complètes de 106 acides aminés plus une répétition incomplète et un domaine PH (*pleckstrin homology*). Nous avons pu confirmer l'interaction directe de la  $\beta$ V-spectrine et de la myosine VIIa *in vitro*.

Dans l'organe de Corti, la distribution spatiale et temporelle de la  $\beta$ V-spectrine à la membrane latérale des cellules ciliées externes est identique à celle de la prestine. La  $\beta$ V-spectrine, du fait de la très grande flexibilité des 30 domaines spectrines qui la composent, permettrait de maintenir l'intégrité de la cellule malgré les contraintes mécaniques auxquelles elle est soumise.

## III. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SURDITÉ LIÉE À L'ATTEINTE DE LA CONNEXINE 30 : RUPTURE DE LA BARRIÈRE ENDOTHÉLIALE DES VAISSEAUX INTRA-STRIAUX

(Martine Cohen-Salmon, Christine Petit ; en collaboration avec Paolo Meda, Genève)

Les connexines sont les constituants des canaux jonctionnels communicants (*gap junction channels*), qui permettent l'échange entre deux cellules voisines d'ions ou de molécules d'une masse inférieure à 1 kDa (métabolites, seconds messagers). Elles jouent un rôle essentiel dans l'audition. En effet, des mutations dans les gènes codant différentes connexines (*CX26*, *CX30*, *CX31*, *CX43*) sont responsables de surdités isolées ou syndromiques chez l'homme. Pour tenter de comprendre le rôle des jonctions communicantes dans l'audition, nous avons produit des lignées de souris déficientes pour les connexines majeures de l'oreille

interne, connexine-26 et connexine-30 (en collaboration avec le groupe de Klaus Willecke, Bonn).

Les souris *Cx30<sup>-/-</sup>* ont une surdité sévère, due en partie à l'absence de production du potentiel endocochléaire par la strie vasculaire. Au sein de la strie vasculaire, la connexine-30 et la connexine-26 sont présentes dans les cellules épithéliales basales et intermédiaires, mais pas dans les cellules marginales. Chez les souris *Cx30<sup>-/-</sup>*, nous avons observé une rupture de la barrière endothéliale des capillaires qui irriguent la strie vasculaire, tandis que les autres épithéliums limitant l'espace intrastrial ne sont pas affectés. Suit un impressionnant réarrangement de l'endothélium et de la membrane basale de ces capillaires. À elle seule, cette rupture de la barrière endothéliale suffit à rendre compte de l'absence de potentiel endocochléaire, par la fuite de charges qu'elle occasionne dans l'espace intrastrial. La compréhension des mécanismes pathogéniques doit prendre en compte le fait que les cellules endothéliales n'expriment pas la connexine 30 et qu'elles ne communiquent pas par des jonctions *gap* avec les cellules intermédiaires et/ou basales de la strie qui, elles, expriment la connexine-30. Par conséquent, la rupture de leurs jonctions serrées est vraisemblablement à mettre sur le compte de la libération de médiateurs provenant des cellules intermédiaires et/ou basales, qui agirait sur les cellules endothéliales. L'étude comparative du transcriptome de la strie vasculaire chez les souris mutantes et sauvages a mis en évidence, chez les souris mutantes, une diminution très importante de l'expression du gène de la bêtaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT) qui entraîne une forte élévation de la concentration locale d'homocystéine. Or, on sait que l'élévation de l'homocystéine provoque des dysfonctionnements endothéliaux, dont le mécanisme n'est qu'en partie élucidé. La rupture de la barrière endothéliale des vaisseaux striaux constitue un nouveau mécanisme physiopathologique de surdité héréditaire mis en lumière.

#### PRINCIPALES PUBLICATIONS DU LABORATOIRE (2005-2006)

##### 2006

Delmaghani S., del Castillo F.J., Michel V., Leibovici M., Aghaie A., Ron U., Van Laer L., Ben-Tal N., Van Camp G., Weil D., Langa F., Lathrop M., Avan P. & Petit C. (2006) Mutations in the gene encoding pejvakin, a novel protein expressed in the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy in man and mouse. *Nat. Genet.*, 38, 770-778.

Petit C. (2006) From deafness genes to hearing mechanisms : harmony and counterpoint. *Trends Mol. Med.*, 12, 57-64.

Rouillon I., Marcolla A., Roux I., Marlin S., Feldmann D., Couderc R., Jonard L., Petit C., Denoyelle F., Garabedian E.N. & Loundon N. (2006) Results of cochlear implantation in two children with mutations in the OTOF gene. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 70, 689-96.

Roux I., Safieddine S., Nouvian R., Grati M., Simmler M.-C., Bahloul A., Perfettini I., Le Gall M., Rostaing P., Hamard G., Triller A., Avan P., Moser T. & Petit C. (2006) Otoferlin, defective in DFNB9 deafness, is essential for Ca<sup>2+</sup>-triggered synaptic exocytosis at the auditory hair cell ribbon synapse. *Cell.*, 127, 277-289.

## 2005

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

Adato A., Lefèvre G., Delprat B., Michel V., Michalski N., Chardenoux S., Weil D., El-Amraoui A. & Petit C. (2005) Usherin, the defective protein in Usher syndrome type IIA, is likely to be a component of interstereocilia ankle links in the inner ear sensory cells. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 3921-32.

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

del Castillo F.J., Rodríguez-Ballesteros M., Álvarez A., Hutchin T., Leonardi E., de Oliveira C.A., Azaiez H., Brownstein Z., Avenarius M.R., Marlin S., Pandya A., Shahin H., Siemerling K.R., Weil D., Wuyts W., Aguirre L., Martín Y., Moreno-Pelayo M.A., Villamar M., Avraham K.B., Dahl H.-H.M., Kanaan M., Nance W.E., Petit C., Smith R.J.H., Van Camp G., Sartorato EL, Murgia A., Moreno F. & del Castillo I. (2005) A novel deletion involving the connexin-30 gene, del (*GJB6-D13S1854*), found in *trans* with mutations in the *GJB2* gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 nonsyndromic hearing impairment. *J. Med. Genet.*, 42, 588-594.

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

El-Amraoui A. & Petit C. (2005) Usher I syndrome : unravelling the mechanisms that underlie the cohesion of the growing hair bundle in inner ear sensory cells. *J. Cell. Sci.*, 118, 4593-603.

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

Feldmann D., Denoyelle F., Blons H., Lyonnet S., Loundon N., Rouillon I., Hadj-Rabia S., Petit C., Couderc R., Garabédian E.-N. & Marlin S. (2005) The *GJB2* mutation R75Q can cause non-syndromic hearing loss DFNA3 or hereditary palmoplantar keratoderma with deafness. *Am. J. Med. Genet.*, 137, 225-27.

Hyenne V., Louvet-Vallée S., El-Amraoui A., Petit C., Maro B. & Simmler M.-C. (2005) Vezatin, a protein associated to adherens junctions, is required for mouse blastocyst morphogenesis. *Dev. Biol.*, 287, 180-91.

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

Loundon N., Marcolla A., Roux I., Rouillon I., Denoyelle F., Feldmann D., Marlin S. & Garabedian E.-N. (2005) Auditory neuropathy or endocochlear hearing loss ? *Otol. Neurotol.*, 26, 748-54.

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

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

Petit C. (2005) Inner ear K<sup>+</sup> homeostasis disorders : what did we learn from the deafness genes ? In *Proceedings of the 5th International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Homeostasis Disorders*, ed. Lim DJ, pp. 9-11. Los Angeles, CA : House Ear Institute.

## ENSEIGNEMENT

### 1. Enseignement au titre du Collège de France

#### 1.a. Cours au Collège de France (6 heures)

Les jeudi 30 mars, 6 avril, 4 mai et 11 mai 2006

**Transmission synaptique dans la cochlée et la rétine : l'affaire des « rubans »**

— **Ruban synaptique et transfert de l'information sensorielle**

— **Rôle des rubans : formation, trafic, fusion des vésicules synaptiques...**

— **Physiologie moléculaire comparative des synapses à rubans et des synapses conventionnelles (1)**

— **Physiologie moléculaire comparative des synapses à rubans et des synapses conventionnelles (2)**

#### 1.b. Cours à l'étranger

• TUNIS — **Tunisie** (3 heures)

20 février 2006 — Invitant : Professeur A. Abdeladhim BEN ABDELADHIM, Directeur Général de l'Institut Pasteur de Tunis

« Synapses : spécificité morphofonctionnelle et moléculaire des synapses à rubans de la cochlée »

• SFAX — **Tunisie** (3 heures)

22 février 2006 — Invitants : Pr Hammadi AYADI, directeur général du Centre de Biotechnologie et Pr Adnen HAMMAMI, doyen de la Faculté de Médecine  
« Physiologie et physiopathologie moléculaire des synapses de la cochlée »

**1.c. Séminaires sous forme d'un colloque**

Collège de France, 19 mai 2006

Conférenciers et programme : voir le site de la chaire

**Les synapses à « rubans » : physiologie, dynamique moléculaire / Ribbon synapses : physiology, molecular dynamics**

**Silvio RIZZOLI** *Synaptic vesicle recycling : insights from different systems*

**Henrique VON GERSDORFF** *Short-term plasticity at ribbon type synapses*

**Leon LAGNADO** *Fast and slow endocytosis at a ribbon synapse*

**William ROBERTS** *Frequency Dependence of Transmitter Release in Frog Saccular Hair Cells*

**Jutta ENGEL** *Ca<sup>2+</sup> currents and synaptic specializations in neonatal and mature inner and outer hair cells*

**Jonathan ASHMORE** *Imaging synaptic release at the cochlear inner hair cell and the implications for the dynamic range problem*

**Elisabeth GLOWATZKI** *Dendritic regulation of afferent activity at the inner hair cell ribbon synapse*

**Tobias MOSER** *Mechanisms underlying high temporal precision sound coding at the hair cell ribbon synapse*

**Saaïd SAFIEDDINE** *Otoferlin, defective in DFNB9 deafness, is essential for the Ca<sup>2+</sup>-triggered synaptic exocytosis at the auditory hair cell ribbon synapse*

2. Enseignements autres

**M2 Génétique Humaine et Neurobiologie (Erasmus)**, novembre 2005

« Hereditary sensory defects »

**M2 Biologie Intégrative et Physiologie — Physiologie et physiopathologie neurosensorielle**, janvier 2006

« Transduction mécano-électrique dans les cellules sensorielles ciliées »

**École de l'INSERM**, 31-1-2006

Formation à la recherche médicale pour étudiants en médecine, odontologie et pharmacie de 2<sup>e</sup> année.

PRINCIPAUX SÉMINAIRES ET CONFÉRENCES SUR INVITATION 2005-2006

**Kresge Hearing Research Institute**, University of Michigan, Ann Harbor, USA, 19-9-2005

« Hereditary deafness : insights into the molecular and cellular mechanisms for hearing »

**Bristol-Myers-Squibb Colloquium**, New York, USA, 19-10-2005

« From hereditary deafness to the molecular mechanisms of hearing »

**Académie des Sciences**, Budapest, Hongrie, 4-11-2005

« From hereditary deafness to the molecular mechanisms of hearing »

**Association for Research in Otolaryngology (ARO) Midwinter Meeting**, Baltimore, USA, 5/9-2-2006

« Otoferlin, defective in DFNB9 human deafness, is necessary for sensory hair cells ribbon synapses exocytosis »

**Euroconference « Sensory perception : Basic mechanisms and human diseases »**, Institut Pasteur, Paris, 9 & 10-3-2006 (membre du comité scientifique d'organisation)

« Surdité héréditaire : des gènes responsables aux mécanismes moléculaires et cellulaires de l'audition »

**Pro-Retina Research Colloquium : Retinal Degeneration — Illuminating Molecular Complexities of the Retina**, Potsdam, Allemagne, 7-4-2006

« Hereditary deafness : from genes to pathophysiology »

**Conférence : Prix Louis-Jeantet de Médecine**, Centre Médical Universitaire, Genève, Suisse, 27-4-2006

« Hereditary deafness : from the genes to molecular physiology »

**Conférence pour la C r monie de remise du Prix, Fondation Louis-Jeantet**, Genève, 28-4-2006

« Surdit s : la part de l'h r dit  »

**Student and Postdoc Sponsored Seminar Series (SPSSS)**, Rockefeller University, New York, USA, 22-5-2006

« From hereditary deafness to the molecular mechanisms of hearing »

**First Joint Meeting of the Cajal and Pasteur Institutes**, Paris, 2-6-2006

« From human hereditary deafness to the cellular and molecular mechanisms of hearing »

**International Congress of the European Society of Pediatric Otorhinolaryngology (ESPO)**, Paris, 19-6-2006

« Genetics and hearing loss »