

## **Génétique et physiologie cellulaire**

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

### **INTRODUCTION À LA TRANSDUCTION MÉCANO-ÉLECTRIQUE AUDITIVE**

#### **De l'anémone de mer à l'oreille des mammifères**

Cette première série de cours consacrés à l'organe sensoriel de l'audition (chez les mammifères, la cochlée) a porté sur la transduction mécano-électrique, processus par lequel la stimulation mécanique de la cellule sensorielle auditive, dite cellule ciliée, est convertie en un potentiel de récepteur. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les transductions sensorielles photo-électrique (vision) ou chimio-électriques (olfaction, gustation), sont assez bien connus. En revanche, pour tous les systèmes qui répondent à une stimulation mécanique (audition, équilibration, toucher, proprioception), les cellules sensorielles sont si peu nombreuses ou si dispersées au sein des tissus que seule l'approche génétique, dont l'efficacité n'est pas contrainte par le nombre de cellules, permet d'en déterminer les composants moléculaires dont le rôle est essentiel. Le cours a eu pour objet d'analyser ce que la connaissance des systèmes sensoriels traitant des stimuli mécaniques, systèmes auditifs et autres, pouvait apporter à la compréhension moléculaire de la transduction mécano-électrique dans les cellules auditives des mammifères.

Ont été exposées et discutées, les caractéristiques physiologiques de la transduction auditive chez les vertébrés, l'évolution de l'organe sensoriel auditif chez les vertébrés, la parenté du système auditif et du système sensoriel de la ligne latérale des poissons et des larves de certains batraciens dont les organes sensoriels, ou neuromastes, permettent à ces animaux de percevoir les mouvements du milieu aqueux dans lequel ils évoluent, et enfin l'origine du système acoustico-latéral chez les deutérostomiens primitifs. Puis a été présentée la réponse au toucher léger chez le nématode *C. elegans*, longtemps considérée comme un modèle de la transduction mécano-électrique auditive des vertébrés, et dont la

dissection génétique a débuté il y a une vingtaine d'années. Nous avons ensuite abordé l'étude de l'organe auditif de la drosophile, l'organe de Johnston, et l'analyse de ses parentés fonctionnelles et moléculaires, révélées par la génétique, avec les soies sensorielles, réceptrices de stimulations tactiles, qui couvrent l'animal. Enfin, quittant les animaux à symétrie bilatérale, nous avons analysé les similitudes entre la touffe ciliaire des cellules sensorielles du système acoustico-latéral des vertébrés et celle des cellules sensorielles des tentacules des anémones de mer, qui permet à ces animaux de détecter les mouvements d'eau.

Notre conclusion, à vrai dire encore assez conjecturale, est que, bien qu'en apparence associée à des microtubules chez la drosophile et aux filaments d'actine chez les vertébrés, la machinerie de transduction mécano-électrique auditive pourrait être très semblable dans les deux cas. Plus, la parenté évolutive probable des systèmes de réponse sensorielle mécanique, en particulier de la réponse auditive et la réponse au toucher ouvre un vaste champ de recherche encore inexploré.

### **L'audition dans le règne animal : son origine et son évolution**

On peut tenter de définir l'audition comme la perception d'ondes de pression se propageant à partir d'une source émettrice. Cependant, la nature physique du stimulus ne saurait à elle seule définir l'audition. En effet, dans la peau, le plus étendu des organes sensoriels récepteurs de stimuli mécaniques, sont présents une variété de récepteurs (extrémités nerveuses libres, disques de Merkel, poils...) dont certains, les corpuscules de Meissner et Pacini, répondent eux aussi à des ondes de pression aérienne. C'est donc la possibilité de décomposer un signal périodique complexe d'ondes de pression en ses fréquences élémentaires (analyse spectrale) par l'organe sensoriel de l'audition, et de recomposer une « image sonore » au niveau des voies auditives centrales et du cortex auditif, à partir des informations électriques issues de cet organe, qui, ensemble, définissent l'audition.

Contrairement aux autres sens « mécaniques », le toucher et la proprioception, l'audition est très peu répandue dans le règne animal. Elle n'est présente que chez les vertébrés (à l'exception des vertébrés primitifs) et chez certains euarthropodes, certains insectes comme la sauterelle, le grillon ou la drosophile, et certains crabes. Comme tous les autres sens, l'audition concourt à la survie des individus en permettant la détection des proies et des prédateurs. Comme la plupart des autres sens, l'audition joue également un rôle dans la perpétuation des espèces, en contribuant à la reconnaissance des partenaires sexuels par le chant nuptial (drosophile, oiseaux). Mais plus que tout autre sens, l'audition occupe une place essentielle dans la communication entre individus d'une même espèce, puisqu'elle conditionne à la fois l'apprentissage et l'utilisation des échanges vocaux. À côté des vocalises spontanées assez répandues chez les vertébrés supérieurs, seules quelques espèces font l'apprentissage d'échanges vocaux, les oiseaux chanteurs, comme les passereaux, les manchots, et quelques mammifères, certains

cétacés, les chauves-souris et l'homme. Dans l'espèce humaine, l'audition conditionne non seulement l'usage de la parole, mais également celui d'un autre mode de communication, la musique.

Afin d'examiner quelle pourrait être l'origine de l'organe sensoriel de l'audition chez les vertébrés, le cours s'est attaché à donner les éléments d'une description anatomo-histologique de la cochlée, organe sensoriel auditif des mammifères, ainsi que quelques rudiments sur son mode de fonctionnement. Les cellules sensorielles, ou cellules ciliées, ont été présentées, et tout particulièrement leur touffe ciliaire, ensemble de microvillosités rigides, appelées à tort stéréocils, qui est la structure réceptrice de l'onde sonore. Dans cette touffe ciliaire, les stéréocils de même taille sont groupés dans une même rangée. Dans chaque touffe ciliaire, on compte 3 à 4 rangées de stéréocils de taille croissante, organisées en V, U ou W, auxquelles est adjoit un cil authentique, ou kinocilium, situé à l'extérieur des stéréocils et sur l'axe de symétrie bilatérale de la touffe. Un ensemble de liens fibreux solidarise les stéréocils. Ce sont des liens latéraux qui unissent les parois d'un stéréocil à celles des stéréocils voisins. De plus, un lien apical, en anglais *tip-link*, unit le sommet d'un stéréocil au côté du stéréocil plus grand adjacent. Ce lien serait, par l'une ou l'autre de ses extrémités, solidaire du canal de transduction mécano-électrique. C'est en raison de son orientation identique à celle de l'axe d'activation mécanique de la touffe ciliaire par la stimulation sonore, qu'il a été proposé que la tension dans le *tip-link*, créée par la déflexion de la touffe ciliaire en réponse à la stimulation sonore, ouvre directement les canaux de transduction (*gating-spring model*). La constante de temps de la transduction, de l'ordre de 10  $\mu$ s, est en effet trop faible pour qu'une cascade enzymatique intermédiaire intervienne. Chez les mammifères, il existe deux types distincts de cellules ciliées. Les cellules ciliées internes (CCI), au nombre d'environ 3 000 chez l'homme, sont d'authentiques cellules sensorielles qui transmettent le message sensoriel au cerveau *via* des fibres nerveuses afférentes. Les cellules ciliées externes (CCE) quant à elles, environ trois fois plus nombreuses, ont un rôle amplificateur du stimulus sonore, et reçoivent principalement une innervation éfférente. La touffe ciliaire des CCI est libre dans l'espace endolymphatique, tandis que celle des CCE est ancrée dans une membrane acellulaire qui recouvre l'épithélium sensoriel, la membrane tectoriale. Enfin, les cellules ciliées répondent chacune avec une sensibilité maximale à une fréquence donnée, dite fréquence caractéristique. Il est possible d'établir un parallèle entre cette propriété et l'architecture des cellules ciliées. Les cellules de grande taille, situées à la base de la cochlée, répondent aux sons de basse fréquence, tandis que les cellules de petite taille situées à l'apex de la cochlée répondent aux sons de haute fréquence. Les touffes ciliaires de ces cellules sont également différentes : stéréocils nombreux (plusieurs centaines), rigides et courts pour les cellules qui répondent aux hautes fréquences ; seulement quelques dizaines de stéréocils, souples et longs pour les cellules qui répondent aux basses fréquences. L'organisation spatiale de ces cellules, dont la morphologie et la fréquence caractéristique changent

graduellement le long de l'axe longitudinal de la cochlée, forme la tonotopie cochléaire.

L'oreille interne des mammifères abrite non seulement la cochlée, mais aussi les 5 organes sensoriels du vestibule, dévolus à l'équilibration. Ces 6 organes sensoriels ont la même origine embryologique, la placode otique. Les organes sensoriels vestibulaires répondent aux accélérations linéaires ou angulaires, et sont très semblables à la cochlée dans leur composition cellulaire. Leurs cellules sensorielles ciliées ressemblent elles aussi à celles de la cochlée, et la génétique révèle aujourd'hui leur parenté moléculaire.

Nous nous sommes ensuite concentrés sur l'apparition de l'audition chez les deutérostomiens. Tout indique aujourd'hui que l'organe de l'audition se serait constitué et aurait évolué à partir d'un organe vestibulaire. Chez les myxinoïdes, qui sont dépourvus de vertèbres et de mandibule, le vestibule est déjà présent mais il est réduit à un seul canal semi-circulaire. En ce qui concerne les premiers vertébrés, les pétrymyzontides, poissons sans mandibule, on note chez un de leurs représentants, la lamproie, l'existence de deux canaux semi-circulaires. À partir des gnatostomes, poissons pourvus d'une mandibule, le vestibule a une structure très semblable à celui des mammifères. Dans ce taxon, apparu il y a environ 440 millions d'années, l'audition devient décelable. Il s'agit alors de la détection d'ondes de fréquence faible, d'environ 800 Hz au maximum. Le spectre fréquentiel s'élargit ensuite vers les hautes fréquences, atteignant 4 kHz chez certains poissons, 12 kHz chez certains oiseaux, et jusqu'à 150 kHz chez certaines chauve-souris et dauphins. Au plan anatomique, l'élargissement du spectre des fréquences analysées s'est accompagné d'un allongement de la cochlée. En parallèle, les cellules sensorielles deviennent de plus en plus petites et leur touffe ciliaire est devenue semblable à une sorte de brosse rigide. Il importe de souligner la constance, chez tous les vertébrés, de cette corrélation entre les caractéristiques morphologiques de la touffe ciliaire et la fréquence caractéristique de la cellule sensorielle.

### **Transduction auditive mécano-électrique chez les vertébrés : caractéristiques physiologiques et pharmacologiques**

L'objectif de cette partie du cours était d'introduire un certain nombre de données élémentaires sur la transduction mécano-électrique dans les cellules de l'oreille interne chez les vertébrés, afin d'éclairer les interrogations qui portent sur la parenté évolutive de cet organe et de ses récepteurs avec d'autres récepteurs sensoriels à des stimulations mécaniques présents dans d'autres taxons.

Les dispositifs expérimentaux permettant la stimulation mécanique des cellules ciliées et l'enregistrement des variations du potentiel de membrane qui en résultent ont été présentés : enregistrements *in vivo*, enregistrements sur l'épithélium sensoriel explanté avec maintien des deux compartiments liquidiens (endolymphatique et périlymphatique) de compositions ioniques différentes, qui baignent

respectivement la touffe ciliaire et la partie baso-latérale des cellules ciliées, enfin enregistrements sur cellule isolée par la technique du *patch-clamp*, avec voltage imposé ou non. Stimulation par déflexion de la touffe ciliaire à l'aide d'une tige rigide, puis souple, ou sous l'effet d'un jet liquidien de basse fréquence. La caractérisation de la transduction a été faite pour l'essentiel dans deux modèles, la papille basilaire (organe de l'audition) de tortue, étudiée par Robert Fettiplace, et le saccule (organe vestibulaire) de crapaud ou de grenouille, étudié par James Hudspeth. À ce jour, chez les mammifères, les seuls enregistrements effectués sur l'épithélium sensoriel auditif l'ont été sur des explants de cochlée de souris prélevés en période néonatale. Ont été discutées les mesures du potentiel microphonique, du potentiel de membrane de la cellule sensorielle, du courant de transduction mécano-électrique, du potentiel d'inversion de ce courant, ainsi que les courbes  $V = f(X)$  et  $I = f(X)$ , représentant les variations du potentiel de membrane et du courant de transduction en fonction de l'amplitude des déplacements imprimés à la touffe ciliaire. Ainsi une dépolarisation maximale est obtenue pour une angulation de  $5^\circ$  de la touffe ciliaire du saccule de grenouille ; 90 % de la conductance maximale est obtenue pour une angulation d'un degré dans ces cellules, et de  $2$  à  $3^\circ$  pour les cellules ciliées externes en période néonatale. La touffe ciliaire présente un maximum de sensibilité autour de sa position de repos, pour laquelle un certain courant est enregistré, correspondant à une probabilité  $P_0$  d'ouverture du canal. La déflexion de la touffe ciliaire en direction des stéréocils les plus hauts conduit à une dépolarisation de la cellule. Son déplacement dans le sens opposé conduit à une hyperpolarisation. Le canal de transduction mécano-électrique aurait une grande conductance élémentaire, d'environ 100 pS.

La sélectivité ionique de ce canal a été étudiée, ainsi que sa sensibilité à un certain nombre de substances. Il s'agit d'un canal cationique non sélectif, perméable aux ions potassium, sodium, calcium, magnésium. Il l'est aussi à des cations trivalents comme le gadolinium, et à un volumineux cation organique monovalent, la N-méthyl-D-glucamine. Sa perméabilité à l'ion calcium est supérieure à sa perméabilité aux cations monovalents. La toxicité des aminoglycosides sur les cellules sensorielles de la cochlée a été très largement étudiée, en raison des baisses de l'acuité auditive parfois très importantes qui sont observées chez certaines personnes à la suite de la prise d'antibiotiques appartenant à cette famille chimique. Aux pH physiologiques, les aminoglycosides se comportent comme de volumineux cations dont le PM atteint, pour certains, 800 Da. Les aminoglycosides bloquent de façon réversible le canal de transduction mécano-électrique. Ce blocage est dépendant du potentiel de membrane ; il est levé lorsque la cellule est dépolarisée. Le site de liaison des aminoglycosides se situe dans la région extracellulaire du canal. L'effet de l'amiloride et de plusieurs de ses dérivés sur la transduction mécano-électrique a été également analysé. Enfin, des résultats récents indiquent que le colorant FM1-43, composé d'une tête porteuse de deux charges positives aux pH physiologiques, traverse le canal. En

effet, chez certaines souris mutantes dont l'endocytose apicale est défectueuse (mutants *shaker-1* défectueux pour la myosine VIIa), on peut mettre en évidence la pénétration du FM1-43 dans la cellule sensorielle lors de la déflexion de la touffe ciliaire ; chez ces mutants, la probabilité d'ouverture du canal de transduction tend vers zéro lorsque la touffe ciliaire n'est pas stimulée, et le FM1-43 ne pénètre pas dans les cellules dont la touffe ciliaire est maintenue dans cette position.

Enfin, quelques éléments de la réponse adaptative à une stimulation prolongée ont été discutés. L'adaptation consiste à restaurer la probabilité d'ouverture du canal à une valeur proche de sa valeur de repos  $P_0$ , alors même que la touffe ciliaire reste stimulée, ce qui a pour effet de restituer à la touffe ciliaire sa sensibilité. Deux types d'adaptation ont été décrits qui diffèrent par leur constante de temps. L'adaptation rapide a une constante de temps qui n'excède pas quelques millisecondes, l'adaptation lente a une constante de temps de plusieurs dizaines voire centaines de millisecondes. Dans le cadre de ce cours, seule l'adaptation rapide nous intéresse car sa constante de temps suggère un mécanisme direct sur le canal lui-même. L'adaptation rapide fait intervenir l'ion calcium, qui exercerait son rétrocontrôle soit en se fixant directement au canal dans sa région intracytoplasmique, soit en se fixant à un de ses ligands.

### **La ligne latérale : le système acoustico-latéral des vertébrés**

Les organes sensoriels de la ligne latérale, ou neuromastes, dérivent eux aussi de placodes. Leurs cellules sensorielles, qui détectent des fréquences basses (quelques dizaines à quelques centaines de Hz), se répartissent, dans chaque neuromaste, en deux groupes que distingue la polarité opposée des touffes ciliaires. Les neuromastes sont coiffées d'une cupule gélatineuse. En 1892, Ayers a émis l'hypothèse d'une continuité évolutive entre la ligne latérale et l'oreille interne, hypothèse dite acoustico-latérale. Cette hypothèse a ensuite été écartée lorsque l'on s'est aperçu que les placodes dont dérivent ces 2 structures étaient distinctes. Aujourd'hui, il ne fait plus guère de doute qu'il s'agit bien de deux systèmes homologues. En effet, l'analyse génétique a révélé que les mêmes gènes sont impliqués dans le développement, la différenciation et le fonctionnement de l'oreille interne et des neuromastes.

En remontant l'arbre évolutif des chordés, on perd la trace du système acoustico-latéral, car chez les céphalochordés, on ne décèle pas de placodes individualisées. Pourtant, aussi bien chez les céphalochordés que chez les urochordés, il existe des cellules sensorielles à collerette, porteuses d'un long cil entouré de microvillosités. Chez les urochordés, ces cellules sont logées dans des organes cupulaires, ainsi appelés en raison du gel qui les couvre. On ignore si, dans ces cellules, la transduction mécano-électrique s'effectue au sein de la structure ciliaire ou des microvillosités. Enfin, ces animaux possèdent également, au stade larvaire, un « organe de l'équilibre », composé d'une ou de quelques cellules porteuses d'un cil.

Nous avons ensuite examiné d'autres cellules réceptrices de stimuli mécaniques pour lesquelles une parenté évolutive avec les cellules sensorielles du système acoustico-latéral est proposée, à savoir, certaines cellules sensorielles que portent les tentacules de l'anémone de mer, des cellules du corps du nématode *Caenorhabditis elegans* qui répondent à une pression légère, et enfin les cellules sensorielles des soies, des récepteurs campaniformes et chordotonaux de *Drosophila melanogaster*. Après une brève description des structures réceptrices chez l'anémone de mer, le cours s'est concentré sur les récepteurs du nématode *C. elegans* et de la drosophile en raison de la proximité évolutive plus importante des protostomiens avec les deutérostomiens et des possibilités d'analyse offertes par l'approche génétique dans ces deux espèces.

### Les tentacules de l'anémone de mer

L'anémone de mer est classée parmi les cnidaires, avec les hydres, les coraux et les méduses. Ces animaux sont caractérisés par la présence d'une cellule urticante, le cnidocyte. Les cnidaires sont considérés comme les animaux les plus simples dotés d'un système nerveux. Leur corps s'apparente à un sac qui s'ouvre sur le milieu extérieur par une bouche entourée de tentacules ; ces dernières détectent les proies et les portent à la bouche. On distingue deux types de projections cellulaires à la surface des tentacules : les cônes ciliaires, de petite taille, et les touffes ciliaires, plus grandes. Les touffes ciliaires perçoivent les mouvements d'eau engendrés par les proies et contrôlent le système effecteur formé des cnidocytes, qui déchargera la toxine dans le corps de la proie *via* la projection d'un minuscule harpon. Ce sont les similitudes morphologiques entre ces touffes ciliaires et celles des cellules sensorielles du système acoustico-latéral qui ont conduit à s'interroger sur la parenté évolutive des deux structures. On retiendra un ensemble d'arguments physiologiques et structuraux en faveur d'une continuité évolutive, tels que le fait que les stéréocils qui composent ces touffes sont d'authentiques microvillosités remplies de filaments d'actine, l'existence d'un lien apical sensible à l'élastase et aux chélateurs du  $\text{Ca}^{2+}$  comme le *tip-link* et la sensibilité du canal de transduction à l'amiloride. Mais il faut souligner que, contrairement à la touffe ciliaire des cellules sensorielles du système acoustico-latéral, la touffe ciliaire des cnidaires est d'origine multicellulaire : un neurone primaire central, porteur de 5 à 7 volumineuses microvillosités, est entouré de quelques cellules (auxquelles il est couplé *via* des jonctions communicantes) dont les microvillosités, plus courtes, sont solidarisées par des liens fibreux avec les précédentes. Aucune approche génétique n'a été développée chez ces animaux. En revanche, une analyse biochimique, bien qu'aujourd'hui balbutiante, est possible, en raison de l'abondance de ces cellules. Ce système simple est fascinant car la réponse des touffes ciliaires à la stimulation mécanique possède une sélectivité fréquentielle chimiquement modulable. Or, il semble que l'on retrouve ici la corrélation entre géométrie de la touffe ciliaire et sélectivité fréquentielle, comme chez les deutérostomiens : en présence d'acide N-acétyl

neuraminique, les touffes ciliaires s'allongeraient et leur fréquence caractéristique diminuerait.

### **La réponse au toucher léger chez *Caenorhabditis elegans***

Depuis plus de 20 ans, une « dissection » génétique de la réponse au toucher léger chez *C. elegans* a été entreprise. Six des 302 neurones que comporte ce nématode sont impliqués dans cette réponse, dont quatre sont latéraux et deux sont ventraux. Ces neurones se distinguent de tous les autres par deux caractéristiques. Ils sont parcourus de microtubules particuliers, formés, non pas de 11 protofilaments comme la plupart des microtubules dans cette espèce, mais de 15 protofilaments. Ces neurones sont entourés d'une structure acellulaire, le manteau, elle-même couverte d'une cuticule, solidaire du manteau en divers points. Ainsi la stimulation mécanique appliquée sur la cuticule est transmise au neurone sous-jacent. Des mutants insensibles au toucher léger ont été identifiés par la disparition de la réaction d'évitement suite à un effleurement corporel. Ces mutants sont appelés *MEC* pour « *mechanical abnormalities* ». Ils se répartissent en 18 loci ; pour chacun d'eux, sauf un, une vingtaine de mutants ont été isolés, et le gène correspondant a été identifié pour 10 loci. Bien que l'atteinte ne porte que sur cette réponse sensorielle, la plupart de ces gènes sont aussi exprimés dans d'autres populations cellulaires. Un seul de ces gènes, *MEC-3*, est impliqué dans la différenciation de ces neurones ; il code pour un facteur de transcription à domaine LIM. Les 9 autres gènes sont classés en trois catégories définies par la cible du déficit : microtubules, manteau et/ou cuticule, ou cible indéterminée.

Ainsi, les gènes *MEC-7* et *MEC-12* codent respectivement pour une  $\beta$ - et une  $\alpha$ -tubuline. Chez ces deux types de mutants, l'absence dans les neurones répondant au toucher léger, des microtubules à 15 protofilaments, et la présence de microtubules à 11 protofilaments, indiquent que cette structure microtubulaire particulière joue vraisemblablement un rôle essentiel dans le processus de transduction.

Les gènes *MEC-1*, *MEC-5* et *MEC-9* appartiennent à la seconde catégorie, celle des anomalies du manteau ou de la cuticule. Les mutants *MEC-1* sont dépourvus de cuticule et de manteau. La protéine codée par *MEC-1* est encore inconnue. Le gène *MEC-5* code pour une protéine de type collagène. *MEC-5* est le seul gène qui n'est pas exprimé par les neurones eux-mêmes mais par les cellules hypodermiques environnantes. Le gène *MEC-9*, est rangé dans cette catégorie en raison du fait qu'il code aussi pour un composant extracellulaire, malgré l'absence d'anomalie ultrastructurale du manteau ou de la cuticule chez ce mutant. La protéine *MEC-9* comporte des domaines inhibiteurs de protéase à sérine de type Kunitz, et des domaines de type EGF.

Enfin, dans la troisième catégorie, on trouve les gènes, *MEC-2*, *MEC-4*, *MEC-6* et *MEC-10*. La fonction possible des protéines codées par *MEC-4* et *MEC-10*, est demeurée inconnue jusqu'à la découverte de leur similarité avec les sous-



unités de canaux ENaC. Les propriétés des canaux ENaC ont été brièvement présentées : conductance ionique, sensibilité à l'amiloride, description de leurs domaines extracellulaire (avec sa large boucle porteuse de domaines riches en cystéines) et intracytoplasmique (fixant la protéine kinase A et la protéine kinase C et médiant le contrôle de leur activité par le  $\text{Ca}^{2+}$  et l'AMPc). Puis nous avons examiné le problème que pose la mise en évidence expérimentale d'une fonction de type canal ionique dépendant d'une stimulation mécanique, pour les protéines codées par *MEC-4* et *MEC-10*. Lorsque les produits des gènes *MEC-4* et *MEC-10* ont été coexprimés par transfection dans des lignées cellulaires, aucun courant n'a pu être enregistré. Toutefois, il existe un ensemble de mutants, mutants *DEG*, dont les mutations se manifestent, non par la simple absence de réponse à une stimulation mécanique corporelle comme chez les mutants MEC, mais par une dégénérescence des neurones récepteurs. Tandis que chez les mutants *MEC-4* et *MEC-10*, les mutations conduisent à une perte de fonction des protéines correspondantes, chez les mutants *DEG*, les mutations qui affectent les mêmes gènes confèrent à la protéine constitutive une activité constitutive, et conduisent à une stimulation permanente délétère de ces neurones ; d'où l'appellation « dégénérines » donnée à ces protéines chez le nématode, et *DEG/EnaC* à cette famille de canaux. Lorsque les produits des gènes *MEC-4* et *MEC-10* sont coexprimés par transfection et que l'un d'eux porte une telle mutation, un courant de très faible intensité peut être détecté. En 2002, il a été démontré que la coexpression de *MEC-2* avec *MEC-4* et *MEC-10*, permettait également d'enregistrer un courant, dont l'intensité était 40 fois supérieure à celle du courant enregistré précédemment lors de la coexpression d'allèles mutés de *MEC-4* et *MEC-10*. Enfin, des similarités de séquence ont été mises en évidence entre le produit de *MEC-2* et la stomatine, petite protéine impliquée dans l'équilibre ionique des globules rouges, et un effet dominant négatif de la stomatine sur le courant enregistré en présence de *MEC-2*, *MEC-4* et *MEC-10*, a été observé. Ainsi, *MEC-2* serait un régulateur d'un canal ionique formé par *MEC-4* et *MEC-10*. *MEC-6* code pour une molécule transmembranaire, régulatrice elle aussi de ce canal. Ces travaux, initiés par Sydney Brenner, et auxquels ont contribué un ensemble de laboratoires (et tout particulièrement celui de Martin Chalfie), ont conduit à la représentation actuelle : *MEC-2*, *MEC-4*, *MEC-6* et *MEC-10* formeraient un canal de transduction, ancré aux microtubules par *MEC-2*, et qui s'ouvrirait lors d'une stimulation mécanique sous l'effet du déplacement de la cuticule et du manteau. Puis ont été passés en revue les autres canaux de type *DEG/ENaC*, dont l'implication dans un processus de transduction mécanique est hautement probable ou démontrée. Le canal défectueux chez le mutant de drosophile *RPK* (*ripped pocket*) et dont la conductance a été mise en évidence dans l'ovocyte de xénope, a été discuté, puis celui défectueux chez le mutant de drosophile *PPK* (*pickpocket*), dont la localisation au niveau des varicosités dendritiques des neurones multidendritiques (type II, voir plus loin) évoque l'implication dans la réponse de ces neurones à une stimulation mécanique. Les éléments qui plaident en faveur de l'implication d'un canal de type ENaC dans la baro-réception de la crosse aortique ont été

présentés. Enfin, BNC1 et DRASIC, qui sont exprimés par des neurones des ganglions rachidiens et situés dans leurs extrémités dendritiques cutanées sensibles à la stimulation mécanique, ont été discutés. L'inactivation du gène qui code pour BNC1 chez la souris a mis en évidence une réduction, et non une abolition, de la sensibilité de certains neurones des ganglions rachidiens. La réponse de neurones de gros diamètre, dont le seuil de stimulation est normalement très bas et l'adaptation rapide, et dont les terminaisons lancéolées entourent les poils de la peau, est affectée en l'absence de BNC1. L'inactivation du gène qui code pour DRASIC se traduit elle aussi par une modification de la sensibilité à la stimulation mécanique de neurones des ganglions rachidiens. Le seuil de sensibilité des neurones susmentionnés diminue, alors qu'il augmente pour les neurones des ganglions rachidiens dont le seuil de stimulation est lui aussi normalement très bas mais dont l'adaptation est lente. BNC1 et DRASIC pourraient former des canaux hétéromériques.

Pour conclure, nous avons examiné les éléments qui plaident en faveur de, ou contre l'implication d'un canal de type ENaC dans la transduction auditive. L'implication de tels canaux apparaît de moins en moins probable au fur et à mesure que leur caractérisation et celle du canal de la transduction auditive progressent : sélectivités ioniques différentes (les canaux ENaC sont davantage perméables aux ions  $\text{Na}^+$  qu'aux ions  $\text{K}^+$ ), affinités pour l'amiloride différentes également (les canaux ENaC ont une affinité plus forte pour l'amiloride et leur sensibilité à l'amiloride n'est pas dépendante du potentiel de membrane, contrairement à celle du canal de transduction des cellules sensorielles auditives).

### **La mécano-réception chez *Drosophila melanogaster***

Les neurones qui répondent à une stimulation sensorielle mécanique chez la drosophile sont de deux types : neurones de type I qui ne comportent qu'une seule dendrite et les neurones de type II, porteurs d'une véritable arborescence dendritique qui innerve la cuticule. Les neurones de type I ont des extrémités dendritiques ciliées et sont associés à des cellules de soutien. On distingue les neurones de type I qui sont associés à des soies qui couvrent le corps et la tête, ceux qui sont associés à des dômes cuticulaires, les organes campaniformes, présents en particulier sur les ailes, et enfin ceux qui sont attachés à une sorte de coiffe non spécialisée et sont présents dans les organes chordotonaux. Un organe chordotonal est composé d'une unité sensorielle dite scolopidie dont la dendrite ciliée est insérée dans une cellule scolopale de soutien. Les organes chordotonaux comprennent les organes subgénéaux, les organes tympaniques et l'organe de Johnston, ou organe de l'audition. L'organe de Johnston se loge dans l'articulation entre les second et troisième segments des antennes ; il est composé de centaines de scolopidies. Sur la face externe de l'antenne à ce niveau émerge l'arista, appendice qui vibre sous l'effet des vagues de pression d'air que provoque le chant nuptial, vibrations qui sont transmises aux scolopidies de l'organe

de Johnston sous-jacent. Quelles ressemblances existent entre ces divers organes et ceux du système acoustico-latéral des vertébrés ? On sait aujourd'hui que le gène *atonal* est impliqué dans la différenciation de ces cellules sensorielles chez la drosophile, tout comme son orthologue chez les vertébrés, *MATH1*, l'est dans la différenciation des cellules sensorielles auditives. Les neurones sensoriels de type I chez la drosophile baignent dans un liquide riche en  $K^+$ , tout comme les cellules sensorielles du système acoustico-latéral. Bien que dans l'un et l'autre cas, la machinerie de transduction s'ancre sur un cytosquelette formé de filaments parallèles, chez la drosophile, ce cytosquelette est constitué de microtubules, alors qu'il est constitué de filaments d'actine chez les vertébrés.

Des méthodes de mesure de l'activité électrique des soies ont été développées qui permettent l'enregistrement du potentiel transépithélial, au repos et après déflexion de la soie. La transduction des soies a un temps de latence presque aussi court que la transduction auditive, ce qui exclut, là aussi, une réaction enzymatique intermédiaire. Comme pour la touffe ciliaire, la sensibilité maximale des soies se situe autour de leur position de repos, et la réponse est directionnelle (dépolérisation/hyperpolarisation. Le déplacement minimal de la soie (en son point d'application sur le neurone cilié) qui permet d'induire une réponse, est du même ordre de grandeur que celui des stéréocils (estimé à 2 nm pour les soies et à 0.3 nm pour les stéréocils). Enfin, comme la réponse des cellules sensorielles du système acoustico-latéral, celle des soies fait l'objet d'un processus d'adaptation lorsque la stimulation se prolonge.

Deux approches génétiques de ces transductions mécaniques chez la drosophile ont été développées. La première avait pour objectif d'isoler des mutants ne répondant pas au toucher léger au stade larvaire. Ces mutants présentaient à l'âge adulte une incoordination motrice de sévérité variable. L'objectif de la seconde approche était de rechercher des mutants dont l'organe de Johnston était défectueux à l'âge adulte ; la sélection a consisté à isoler des mouches ne répondant pas à une fréquence sonore de 160 Hz (fréquence de l'un des composants du chant nuptial). Les résultats obtenus avec chacune de ces stratégies ont été examinés et comparés.

L'étude du potentiel de récepteur des soies des onze mutants ne répondant pas au toucher léger a conduit à une classification des mutants en 3 groupes : ceux dont le potentiel de récepteur était normal (atteinte portant sur la coordination motrice), ceux qui étaient dépourvus de tout potentiel (mutants *Nomp* = *no mechanoreceptor potential*), et ceux dont le potentiel de récepteur était réduit (mutants *Remp* = *reduced mechanoreceptor potential*). Chez les mutants *Nomp* et *Remp*, on ne pouvait déceler de potentiels évoqués au niveau du nerf de l'antenne associé à l'organe de Johnston, exception faite du mutant *NompC* chez lequel l'amplitude de la réponse était seulement réduite de moitié. Chez ces mutants, l'atteinte portait donc non seulement sur la sensibilité tactile, mais aussi sur la réponse de l'organe de Johnston et la réponse proprioceptive. Ceci indique

que bien des composants essentiels pour la transduction d'un stimulus tactile le sont aussi pour la transduction auditive.

En revanche, chez onze des douze mutants ne répondant pas à une stimulation sonore de 160 Hz, et qui étaient par ailleurs dépourvus d'incoordination motrice, des potentiels d'action sur le nerf antennaire étaient enregistrés. Donc, aucun de ces mutants, sauf un, n'était affecté dans la perception auditive : c'est la réponse réflexe de l'animal à la stimulation auditive qui était sans doute altérée. La mise en évidence, dans ce second crible, d'un seul mutant atteint dans le processus auditif et dont la coordination motrice était par ailleurs normale, corrobore la conclusion énoncée précédemment à partir de l'analyse des mutants insensibles au toucher léger.

Deux mutants ont retenu l'attention, celui qui vient d'être mentionné, et un autre issu de l'autre crible, chez lesquels la réponse antennaire est atteinte mais pas celle des soies. Les deux mutations affectent toutefois la structure microtubulaire des neurones de type I. C'est peut-être la taille différente de cette structure dans les soies et l'organe de Johnston, et le type des stimulations physiques auxquelles elle est soumise dans l'un et l'autre cas, pression dans les soies et étirement dans l'organe de Johnston, qui expliquent ce résultat.

Puis nous avons examiné les mutants *Nomp* pour lesquels le gène impliqué a été identifié. Nous nous sommes concentrés sur les mutants *NompC*. Une série de quatre allèles avaient été rapportée, dont l'un était associé à une adaptation de la réponse des soies plus rapide que celle enregistrée chez les drosophiles sauvages, ce qui suggérait une implication assez directe du produit du gène *NompC* dans la transduction. Le gène *NompC* a été isolé. Il code pour une protéine comportant 6 domaines transmembranaires, et 29 répétitions de type ankyrine. Il est exprimé dans tous les neurones récepteurs de type I mais pas dans les neurones de type II. Ces derniers expriment le canal DEG/ENaC, muté chez les mutants *PPK* (voir plus haut). Un orthologue de *NompC* est décelé dans le génome de *C. elegans*. Cet orthologue ne s'exprime pas dans les six neurones de réception tactile susmentionnés, mais il s'exprime dans quatre neurones, plus antérieurs, qui répondent eux aussi à la stimulation mécanique. *NompC* est une protéine que sa séquence d'acides aminés permet de classer dans la famille des canaux TRP (pour *Transient Receptor Potential*), dont le premier représentant découvert a été le canal de transduction des photorécepteurs de drosophile. Nous avons décrit cette famille de canaux qui s'apparente par leur structure aux canaux calciques dépendants du voltage. Nous nous sommes intéressés brièvement aux diverses sous-familles de TRP, à leur sélectivité ionique et à leur régulation. Enfin, parmi les TRP, nous nous sommes attardés sur ceux dont le déficit chez la souris, se traduit par l'atteinte d'une réponse sensorielle : atteinte olfactive, perte de la réponse au chaud ou au froid. Nous avons aussi évoqué deux autres TRP défectueux dans les formes 1 et 2 de polykystose rénale : ils sont présents dans les cils primaires de certaines cellules du rein, cils que l'on considère aujourd'hui comme des récepteurs de stimuli mécaniques.

Nous avons conclu en nous interrogeant sur la stratégie génétique mise en œuvre pour identifier la machinerie de transduction auditive chez les mammifères. L'enseignement que l'on peut tirer des travaux effectués chez la drosophile est qu'il est prudent de ne pas s'en tenir à la recherche des gènes responsables d'atteintes isolées de l'audition, car cette machinerie pourrait être partagée par bien d'autres cellules qui répondent à la stimulation mécanique. Enfin, si durant plusieurs années on a considéré que le canal de transduction auditive appartenait sans doute à la famille des canaux DEG/ENaC, les canaux de type TRP paraissent aujourd'hui constituer de meilleurs candidats.

C. P.

#### ÉLÉMENTS BIBLIOGRAPHIQUES EN RELATION AVEC LE COURS

##### *Références bibliographiques générales*

The mechanosensory lateral line. *Neurobiology and evolution* (1989). Coombs S., Goerner P., Muenz H. (eds). Springer Verlag.

The evolutionary biology of hearing (1992). Webster D., Fay R.R., Popper A.N. (eds). Springer.

The cochlea (1996). Dallos P., Popper A.N., Fay R.R. (eds). vol. 8. Springer (New York).

##### *Mécanoréception et canaux dégénérines/ENaC chez Caenorhabditis elegans*

Brenner S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.

Driscoll M. & Chalfie M. (1991) The Mec-4 gene is a member of a family of *Caenorhabditis-Elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Nature*, 349, 588-593.

Tavernarakis N. & Driscoll M. (1997) Molecular modeling of mechanotransduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Annu. Rev. Physiol.*, 59, 659-689.

Adams C.M., Anderson M.G., Motto D.G., Price M.P., Johnson W.A. & Welsh M.J. (1998) Ripped Pocket and Pickpocket, novel *Drosophila* DEG/ENaC subunits expressed in early development and in mechanosensory neurons. *J. Cell. Biol.*, 140, 143-152.

Drummond H.A., Price M.P., Welsh M.J. & Abboud F.M. (1998) A molecular component of the arterial baroreceptor mechanotransducer. *Neuron*, 21, 1435-1441.

Garcia-Anoveros J., Garcia Jesus A., Liu J.-D. & Corey D.P. (1998) The nematode degenerin UNC-105 forms ion channels that are activated by degeneration- or hypercontraction-causing mutations. *Neuron*, 20, 1231-1241.

Benos D.J. & Stanton B.A. (1999) Functional domains within the degenerin/epithelial sodium channel (Deg/ENaC) superfamily of ion channels. *J. Physiol.*, 520, 631-644.

Alvarez de la Rosa D., Canessa C.M., Fyfe G.K. & Zhang P. (2000) Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annu. Rev. Physiol.*, 62, 573-594.

Price M.P., Lewin G.R., McIlwrath S.L., Cheng C., Xie J., Heppenstall P.A., Stucky C.L., Mannsfeldt A.G., Brennan T.J., Drummond H.A., Qiao J., Benson C.J., Tarr D.E., Hrstka R.F., Yang B., Williamson R.A. & Welsh M.J. (2000) The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature*, 407, 1007-1011.

Goodman M.B., Ernstrom Glen G., Chelur Dattananda S., O'Hagan R., Yao C.A. & Chalfie M. (2002) MEC-2 regulates *C. elegans* DEG/ENaC channels needed for mechanosensation. *Nature*, 415, 1039-1042.

#### *Mécanoréception et canaux TRP chez la drosophile*

Thurm U. (1965) An insect mechanoreceptor. I. Fine structure and adequate stimulus. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 30, 75-82.

Thurm U. (1965) An insect mechanoreceptor. II. Receptor potentials. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 30, 83-94.

Kernan M., Cowan D. & Zuker C. (1994) Genetic dissection of mechanosensory transduction : mechanoreception-defective mutations of *Drosophila*. *Neuron*, 12, 1195-1206.

Kernan M. & Zuker C. (1995) Genetic approaches to mechanosensory transduction. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 5, 443-448.

Eberl D.F., Duyk G.M. & Perrimon N. (1997) A genetic screen for mutations that disrupt an auditory response in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 94, 14837-14842.

Eberl D.F., Hardy R.W. & Kernan M.J. (2000) Genetically similar transduction mechanisms for touch and hearing in *Drosophila*. *J. Neurosci.*, 20, 5981-5988.

Walker R.G., Willingham A.T. & Zuker C.S. (2000) A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science*, 287, 2229-2234.

Chung Y.D., Zhu J., Han Y.-G. & Kernan M.J. (2001) *nompA* encodes a PNS-specific, ZP domain protein required to connect mechanosensory dendrites to sensory structures. *Neuron*, 29, 415-428.

Minke B. & Cook B. (2002) TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol. Rev.*, 82, 429-472.

## ACTIVITÉ DE RECHERCHE DU LABORATOIRE

Comprendre les mécanismes qui sous-tendent le fonctionnement des systèmes sensoriels est un objectif auquel l'étude des dysfonctionnements héréditaires de ces systèmes peut contribuer depuis que les outils d'analyse génétique, puis génomique, ont été développés. C'est ainsi que dès la fin des années 1980, le laboratoire s'est intéressé à l'olfaction, *via* le syndrome de Kallmann de Morsier, dont il a identifié un des gènes responsables, *KAL-1*, en 1991. L'étude du rôle de la protéine codée par ce gène, l'anosmine-1, a mis en évidence les difficultés de l'analyse moléculaire d'un système à partir d'une molécule unique révélée par l'analyse génétique de ce système. D'où l'option de s'appuyer sur une variété de dysfonctionnements héréditaires d'un même système. Parmi les organes sensoriels, la rétine, en raison du grand nombre de cellules sensorielles qu'elle comporte, 130 millions de bâtonnets et 6 millions de cônes, se prête à une approche biochimique qui a permis de découvrir les premiers éléments de la transduction photoélectrique. Au début des années 1990, notre choix s'est porté sur l'étude des surdités héréditaires humaines pour deux raisons : (1) elles constituaient alors un domaine inexploré de la pathologie sensorielle héréditaire, (2) elles devaient permettre d'aborder les bases moléculaires du développement et du fonctionnement de la cochlée (organe récepteur de l'audition), alors totalement inconnues.

On savait que la plupart des surdités héréditaires isolées (non associées à d'autres signes cliniques), et tout particulièrement les formes précoces, sont dues à des atteintes de la cochlée, et que ces formes de surdité correspondent à plusieurs dizaines d'atteintes monogéniques ; leur nombre était estimé entre 30 et 100, mais leur étude génétique se heurtait à des difficultés spécifiques. L'absence complète de données moléculaires concernant la cochlée pouvait, quant à elle, s'expliquer par le petit nombre de cellules de chaque type dans cet organe : cet aspect quantitatif fait obstacle à toute recherche de nouvelles molécules par une approche de biochimie ou de génétique moléculaire classique. Pour accéder aux bases moléculaires du fonctionnement de la cochlée, l'approche génétique semblait par contre prometteuse.

*Syndrome de Kallmann*

Ce syndrome, génétiquement hétérogène, est la seule anosmie généralisée héréditaire connue à ce jour. Chez les personnes atteintes, les bulbes olfactifs sont absents ou hypoplasiques. L'anosmie est associée à un hypogonadisme d'origine centrale dû à un déficit en gonadolibérine (GnRH). Or, des liens développementaux ont été décrits entre les systèmes olfactif et neuroendocrinien de la reproduction, que l'isolement des gènes responsables de la maladie devrait contribuer à comprendre en termes moléculaires. Le gène *KAL-1*, que nous avons isolé en 1991, est responsable de la forme liée au chromosome X de la maladie. L'étude de la fonction de la protéine qu'il code, l'anosmine-1, s'est heurtée à l'absence d'identification du gène orthologue chez la souris ; le séquençage en cours du génome murin n'a d'ailleurs toujours pas révélé ce gène. Les premières études

ont donc été menées chez le poulet. Toutefois, grâce à l'obtention d'anticorps dirigés contre la protéine humaine, nous avons pu récemment réaliser des travaux qui éclairent les rôles de cette protéine au cours du développement. L'anosmine-1 est un composant transitoire de certaines membranes basales et matrices interstitielles pendant la période de l'organogenèse. Dans le système olfactif en développement, la protéine est présente dans le territoire présomptif des bulbes olfactifs au moment où les premiers axones des neurones sensoriels olfactifs atteignent cette région. Par des tests *in vitro*, nous avons établi que l'anosmine-1 se lie à la membrane des cellules par l'intermédiaire de protéoglycannes à héparane sulfate. Plus récemment, la mise en évidence, chez l'embryon de rat, de l'anosmine-1 (1) le long du tractus olfactif latéral (neurones mitraux et touffus), dès sa formation et (2) dans le cortex olfactif, de façon contemporaine, a été à l'origine d'une série d'expériences qui ont permis de montrer que l'anosmine-1 est impliquée dans le branchement et le guidage axonal. La présence de l'anosmine-1 conditionne l'émergence des branches du tractus olfactif latéral et leur projection sur le cortex olfactif, comme le montre l'inhibition de ces deux activités en présence d'anticorps sur des cultures d'explants de bulbe olfactifs et cultures organotypiques d'hémisphères télencéphaliques. Pourtant plusieurs éléments plaident en faveur d'un processus pathogénique bloquant le développement du système olfactif à une étape antérieure, dans le syndrome de Kallmann. L'identification récente, en collaboration avec Catherine Dodé (Hôpital Cochin), du gène *KAL-2* responsable d'une forme dominante de la maladie apporte un nouvel élément en faveur de cette hypothèse. Ce gène code pour le récepteur FGFR1. Or, de façon concomitante, une autre équipe observait que chez des souris dont le gène *Fgfr1* est inactivé de façon conditionnelle dans le télencéphale, l'évagination des bulbes olfactifs ne se produit pas. Nous pensons que l'anosmine-1 module la signalisation FGF impliquée dans ce processus morphogénétique.

### **Surdités héréditaires humaines**

Le terme surdité recouvre en fait un ensemble très hétérogène d'atteintes auditives, dont la classification repose sur différents critères : (i) le degré de la perte auditive (surdité légère, modérée, sévère, profonde), (ii) la localisation anatomique de l'atteinte ; on distingue les surdités de transmission, pour lesquelles l'atteinte se situe dans l'oreille externe ou moyenne, et les surdités de perception (ou neurosensorielles), dues à une anomalie de l'oreille interne ou des voies nerveuses, (iii) l'association éventuelle à d'autres signes cliniques (surdités syndromiques ou isolées).

Les données épidémiologiques provenant de l'étude de populations vivant dans des pays développés indiquent qu'un enfant sur 700 présente une surdité sévère ou profonde dès la période prélinguale (i.e. période précédant l'acquisition du langage parlé). Dans environ un tiers des cas, la surdité s'intègre dans un syn-



drome. Un individu sur 500 souffre d'une perte auditive importante avant l'âge adulte. Les formes d'apparition postlinguale sont, en règle générale, isolées, progressives, et moins sévères que les formes prélinguales. Enfin, 0,3 % de la population entre 20 et 50 ans et 2,3 % de la population entre 60 et 70 ans souffrent d'une perte auditive supérieure à 65 dB (décibels). Les surdités isolées du sujet jeune sont presque exclusivement des surdités de perception, les formes tardives correspondent plus fréquemment à une surdité de transmission. Plus de 300 syndromes comportant une surdité sont répertoriés.

Le mode de transmission des surdités isolées de l'enfant est autosomique récessif (DFNB) dans plus de 80 % des cas, autosomique dominant (DFNA) dans 10 à 15 % des cas, et récessif lié au chromosome X (DFN) dans 1 à 2 % des cas. Il semble que les formes d'apparition plus tardive soient transmises le plus souvent sur le mode autosomique dominant. La multiplicité des obstacles auxquels se heurte l'analyse de ségrégation dans le cas des surdités, explique que pas un seul des loci correspondant au mode de transmission le plus fréquent (DFNB) n'avait été défini en 1993, date à laquelle nous avons entrepris ce travail. À la très grande hétérogénéité génétique de ce déficit sensoriel, et à l'absence de signe clinique permettant de distinguer les atteintes auditives dues à l'anomalie de gènes différents, s'ajoutent deux difficultés spécifiques : (i) une surdité d'origine génétique et une surdité de cause environnementale (souvent la conséquence d'une infection, parfois passée inaperçue) peuvent coexister au sein d'une même famille, (ii) les unions entre personnes malentendantes sont particulièrement fréquentes dans les pays développés (90 % aux États-Unis). Dans les familles ainsi formées, plusieurs gènes mutés peuvent être présents, dont on ne pourra suivre la transmission en l'absence de critères cliniques distinctifs. Pour contourner ces obstacles, nous avons étudié de grandes familles affectées par ce handicap sensoriel et vivant dans des isolats géographiques depuis plusieurs générations. Puisque les isolats géographiques sont en règle générale fondés par un petit nombre de personnes, on pouvait faire l'hypothèse que la présence d'une surdité dans une famille résulterait d'une atteinte génique unique. Cette démarche a été possible grâce au réseau des collaborations que nous avons établies avec des scientifiques et des cliniciens de divers pays du bassin méditerranéen. Ainsi, nous avons pu localiser sur les chromosomes humains les deux premiers gènes responsables de surdité autosomique récessive isolée, DFNB1 et DFNB2.

L'hétérogénéité génétique des surdités isolées est telle que, pour réduire l'intervalle de localisation chromosomique d'un gène impliqué, seules peuvent être prises en considération les données provenant de familles malentendantes suffisamment grandes pour que la liaison génétique obtenue soit significative. La densité chromosomique prédictible de ces gènes invite même à se garder d'utiliser les informations provenant de familles dont la surdité est en apparence liée au même locus mais dont l'origine géographique est différente. Ainsi, l'intervalle chromosomique de localisation qui peut être défini excède-t-il dans bien des cas 5 ou 10 cM. Il y a peu encore, de tels intervalles ne se prêtaient guère à l'identi-

fication d'un gène par clonage positionnel. Le séquençage du génome humain permet désormais de considérer cette possibilité, mais la démarche demeure longue et fastidieuse. Les gènes responsables de maladie peuvent également être identifiés par une stratégie de gènes candidats. En l'absence de caractérisation des composants moléculaires de l'oreille interne, cette approche, plus aisée que le clonage positionnel, ne pouvait être entreprise. Nous avons pris comme hypothèse de travail que les protéines qui s'expriment exclusivement ou préférentiellement dans la cochlée exercent vraisemblablement un rôle critique dans cet organe et qu'en conséquence, les anomalies des gènes correspondants conduiraient à un déficit auditif. À travers l'isolement de ces gènes, un autre objectif était visé : l'obtention de promoteurs dont l'activité permettrait de diriger de façon sélective la transcription de tout gène d'intérêt dans une population cellulaire particulière de l'oreille interne. Pour rechercher des transcrits spécifiquement ou préférentiellement exprimés dans l'oreille interne, nous avons généré successivement plusieurs banques d'ADNc soustraites d'excellente qualité, dans des conditions expérimentales différentes. C'est ainsi que nous avons identifié, puis caractérisé, la protéine majeure des otoconies, que nous avons appelée otoconine-95, et cinq des gènes responsables de surdité que nous avons récemment découverts (voir plus loin). Depuis 1995, nous avons identifié les gènes responsables de deux formes du syndrome de Usher de type I (USH1B et USH1C), qui associe une surdité neurosensorielle profonde et une rétinopathie pigmentaire évoluant vers la cécité, ainsi qu'un gène défectueux dans le syndrome branchio-oto-rénal. Nous avons également identifié les gènes atteints dans cinq formes de surdité isolée récessive (DFNB2, DFNB9, DFNB16, DFNB18, DFNB21) et deux formes de surdité isolée dominante (DFNA2, DFNA3). En 2002-2003, nous avons ajouté à cette liste les gènes impliqués dans les surdités isolées DFNB22 et DFNB31, et dans une autre forme du syndrome de Usher de type I, USH1G. Ces gènes codent respectivement pour l'otoancorine, la whirline, et la protéine SANS.

Par des approches expérimentales complémentaires, nous avons obtenu un ensemble de résultats sur la fonction des protéines codées par ces gènes. On retiendra que ces gènes interviennent pour la plupart dans l'un des quatre processus suivants : (1) la structure de la membrane tectoriale, membrane acellulaire qui couvre l'épithélium sensoriel auditif et qui participe à la transmission de l'énergie de l'onde sonore à la touffe ciliaire des cellules sensorielles, (2) le développement de la touffe ciliaire, structure réceptrice du son composée d'un ensemble de microvillosités rigides, les stéréocils, et qui abrite la machinerie de transduction mécano-électrique, (3) le fonctionnement de la synapse des cellules sensorielles (synapse à « rubans »), et (4) la communication entre cellules par les jonctions communicantes.

- **Composants des membranes acellulaires** : Deux composants spécifiques de l'oreille interne ont été isolés, l'otogéline et l'otoancorine, qui entrent tous deux dans la composition de membranes acellulaires. Ces deux protéines, ainsi que l' $\alpha$ -tectorine déjà identifiée, sont impliquées dans 3 formes de surdité

isolée récessive. L'inactivation chez la souris, du gène codant pour l'otogéline a été réalisée ; l'analyse des souris mutantes a permis de proposer pour cette protéine, un rôle dans la résistance mécanique de la membrane tectoriale au stress sonore.

- **Développement de la touffe ciliaire** : Quatre composants de la touffe ciliaire ont été identifiés : la myosine VIIa, la whirline, l'harmonine et la stéréociline. Les mutations des gènes codant pour la myosine VIIa et l'harmonine sont responsables d'un syndrome de Usher de type I (formes USH1B et USH1C), plus rarement d'une surdité isolée.

Il existe des souris mutantes déficientes pour la myosine VIIa, les souris *shaker-1*, dont l'analyse histopathologique a mis en évidence une désorganisation de la touffe ciliaire. Nous avons montré que, parmi les mutants « *circler* » chez le poisson zébré, ceux de la sous-classe « *mariner* » portent des mutations dans le gène de la myosine VIIa ; chez les mutants *mariner*, la touffe ciliaire est désorganisée, attestant de la conservation du rôle de la myosine VIIa à travers l'évolution des vertébrés. Harmonine et whirline sont deux molécules à domaines PDZ, protéines sous-membranaires qui organisent des complexes protéiques. Les souris *whirler*, déficientes en whirline, ont des stéréocils plus courts que les souris normales.

La queue des myosines non conventionnelles, qui varie de l'une à l'autre, se lie à des protéines sur lesquelles la force motrice de la myosine s'exerce. Les structures auxquelles ces protéines sont associées sont alors mises sous tension, et peuvent même dans certains cas se déplacer. Dans le but de comprendre le rôle de la myosine VIIa, une étude de ses ligands a été entreprise. Elle nous a permis d'identifier une nouvelle molécule transmembranaire ubiquitaire des jonctions intercellulaires d'adhérence, appartenant au même complexe que la E-cadhérine, que nous avons appelée vezatine, et ainsi de proposer un rôle pour la myosine VIIa dans l'adhérence entre les cellules. Cette molécule est également présente à la base des stéréocils durant leur formation, puis disparaît comme le font les liens interstéréociliaires basaux auxquels elle est vraisemblablement associée. Nous avons ensuite montré que la myosine VIIa est une protéine d'ancrage de la protéine kinase A. Un second ligand que nous avons appelé MyRIP (pour *myosin VIIa rab associated protein*), se lie à rab27, présent à la surface des mélanosomes, expliquant ainsi l'anomalie de position des mélanosomes dans les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine chez les patients atteints du syndrome USH1B. Au cours de l'année 2002, en nous fondant sur nos résultats impliquant la myosine VIIa dans l'adhérence et sur la découverte, par un autre groupe, de l'implication de la cadherine-23 dans une autre forme du syndrome de Usher de type I (USH1D), dont le modèle murin est caractérisé, comme chez les mutants *shaker-1*, par une désorganisation de la touffe ciliaire, nous avons émis l'hypothèse d'une contribution des divers produits des gènes *USH1* à une même fonction. De fait, nous avons observé que la cadherine-23 forme des liens interstéréociliaires embryonnaires

transitoires. Nous avons montré que les isoformes b de l'harmonine, d'une part se lient aux filaments d'actine et induisent leur regroupement en faisceaux, et d'autre part interagissent avec la cadhérine-23. Tout comme la cadhérine-23, l'harmonine b est présente dans la touffe ciliaire en développement, et disparaît ensuite. Enfin, nous avons mis évidence une anomalie de la distribution subcellulaire de l'harmonine b chez les souris *shaker-1* ; chez ce mutant, l'harmonine b est absente de la touffe ciliaire et s'accumule à sa base, ce qui indique que la myosine VIIa transporte probablement l'harmonine b vers le sommet du stéréocil. Ainsi, trois protéines défectueuses dans trois formes du syndrome de Usher de type I concourent à un réseau d'interactions moléculaires, qui contribue à la cohésion de la touffe ciliaire en croissance en solidarissant ses stéréocils par l'ancrage des liens qui les connectent aux filaments d'actine formant le cytosquelette de chaque stéréocil. De plus, nous avons récemment montré que la protéine codée par le gène *SANS* interagit elle aussi avec l'harmonine.

- **Synapses des cellules sensorielles** : Dans une étude collaborative avec Thomas Jentsch (ZMNH, Hambourg, Allemagne), nous avons montré que la surdité DFNA2 est due à un défaut du canal potassique KCNQ4, exprimé principalement par les cellules ciliées externes (dont la fonction essentielle est l'amplification de la stimulation sonore) et les neurones de la voie auditive centrale. Ce canal véhiculerait le courant  $I_{K,n}$  au pôle basal des cellules ciliées externes. Surtout, l'identification du gène responsable d'une autre forme de surdité récessive, DFNB9, nous a conduit à découvrir l'otoferline, protéine qui appartient à la même famille que les dysferlines. Un faisceau d'arguments plaide aujourd'hui en faveur de son implication dans le fonctionnement de la synapse des cellules ciliées internes (authentiques cellules sensorielles auditives). Si tel est le cas, l'otoferline fournirait un point d'entrée pour l'étude des bases moléculaires de la spécificité fonctionnelle de l'appareil synaptique de ces cellules.
- **Jonctions communicantes** : Nous avons décrit l'implication de la connexine26 dans une forme de surdité dominante (DFNA3). La connexine26 est aussi défectueuse dans une forme de surdité récessive, DFNB1, dont nous avons montré qu'elle rend compte, à elle seule, d'environ un tiers des cas de surdité de l'enfant. Les deux réseaux cellulaires cochléaires formés par des jonctions communicantes, le réseau épithélial et le réseau fibrocytaire, expriment la connexine26. Ils expriment aussi la connexine30, dont le déficit conduit également à une surdité. Compte tenu de la fréquence de la forme de surdité DFNB1, nous nous sommes engagés dans l'étude de sa pathogénie. L'inactivation ubiquitaire du gène qui code pour la connexine26 est létale chez la souris. Il fallait donc générer une inactivation conditionnelle. En utilisant le promoteur du gène de l'otogéline (voir ci-dessus), une inactivation conditionnelle du gène qui code pour la connexine26 (*Cx26*) a été réalisée dans le réseau épithélial. Nous avons analysé le phénotype des souris mutantes obtenues, ainsi que celui de souris chez lesquelles le gène qui code pour la connexine30 (*Cx30*) avait été inactivé de façon ubiquitaire. Chez les deux mutants, le développement de

l'oreille interne est normal. Les deux mutants présentent une baisse de l'acuité auditive, mais pas d'atteinte vestibulaire. Dans les deux cas, une apoptose des cellules de l'épithélium sensoriel auditif est observée dès le début de la 3<sup>e</sup> semaine postnatale, c'est-à-dire peu après que les souris sauvages ont commencé à entendre. De surcroît, le potentiel endocochléaire, qui apparaît normalement dès la 2<sup>e</sup> semaine de vie, n'est pas décelé chez les souris *Cx30<sup>-/-</sup>*. Ce résultat nous permet de conclure au rôle essentiel de la connexine30 dans la strie vasculaire, site de la production de ce potentiel transépithélial (entre compartiments endolymphatique et périlymphatique).

**Les implications médicales :** Notre orientation thématique s'est accompagnée, très rapidement, de l'ouverture d'une consultation de conseil génétique à l'hôpital Pasteur, destinée aux familles comportant des individus sourds. Cette consultation a été transférée en 1999 à l'hôpital d'Enfants Armand-Trousseau suite à la fermeture de l'hôpital Pasteur. C'est grâce à ce couplage étroit avec l'activité clinique que nous avons pu observer qu'en dépit du fait qu'une centaine de gènes peuvent être à l'origine de surdité congénitale, les anomalies du gène qui code pour la connexine26 rendent compte, à elles seules, d'environ un tiers des cas de surdité profonde héréditaire de l'enfant. Une mutation particulière (35delG) a été mise en évidence chez la plupart des individus atteints. Le diagnostic moléculaire de cette forme de surdité récessive, DFNB1, a été développé.

La demande de conseil génétique émane généralement de parents entendants qui ont un enfant sourd et souhaitent connaître le risque de récurrence de l'atteinte auditive pour les enfants à venir. Or, il est communément admis que les causes non héréditaires de surdité, principalement infectieuses, passent souvent inaperçues. En raison de la forte prévalence de l'atteinte du gène *CX26* dans la surdité héréditaire, le diagnostic moléculaire permet aujourd'hui, bien souvent, d'affirmer l'origine génétique de la surdité en dehors de tout contexte familial évocateur. Enfin, une étude prospective approfondie sur plus de cent familles, a fourni les éléments d'une description clinique fine de cette forme de surdité. Les données obtenues permettent aujourd'hui d'informer les familles de la variabilité de l'atteinte auditive, même au sein d'une fratrie, et de son absence probable d'aggravation chez un individu donné. Un travail d'information régulier portant sur l'avancée des connaissances dans le domaine des surdités héréditaires auprès des associations de malentendants, et d'animation de discussions sur leurs implications sociales, familiales et individuelles est effectué principalement par l'équipe de l'hôpital Trousseau associée à notre laboratoire et que dirige le Pr Françoise Denoyelle.

\*

\*\*

Ces résultats ont été obtenus grâce à la synergie des activités des différents membres du laboratoire. Les banques d'ADNc soustraites générées par certains ont aussi servi à d'autres pour isoler des gènes de surdité ; elles ont été la source

de promoteurs utilisés par plusieurs pour générer des inactivations conditionnelles de gènes dans l'oreille. Compte tenu de la structure complexe de l'oreille interne, les connaissances en histologie et en embryologie de certains ont été précieuses pour permettre le passage de l'isolement des gènes responsables de surdité à l'étude de la pathogénie des formes de surdité correspondantes. Un véritable transfert de connaissances entre spécialistes de biologie moléculaire, embryologistes et médecins ORL, s'est rapidement produit. L'un des membres du laboratoire a suivi une formation en électrophysiologie et un électrophysiologiste a rejoint l'unité. Un dialogue étroit entre ceux qui cherchent de nouveaux gènes impliqués dans la surdité et ceux qui travaillent à définir les réseaux d'interaction moléculaire où s'insèrent les produits des gènes déjà identifiés, a été source d'idées et de résultats pour les uns et les autres. L'articulation constante avec la clinique a permis de mettre en évidence la fréquence de l'atteinte du gène de la connexine26, d'apporter la première description clinique d'une forme génétique de surdité isolée et surtout d'évaluer les implications médicales de nos travaux. L'activité de conseil génétique pour les familles comportant des individus sourds s'est considérablement améliorée.

#### PUBLICATIONS

2002

Boëda B., El-Amraoui A., Bahloul A., Goodyear R., Daviet L., Blanchard S., Perfettini I., Fath K.R., Shorte S., Reiners J., Houdusse A., Legrain P., Wolfrum U., Richardson G. & Petit C. (2002) Myosin VIIa, harmonin, and cadherin 23, three Usher I gene products, cooperate to shape the sensory hair cell bundle. *EMBO J.*, 21, 6689-6699.

Chapiro E., Feldmann D., Denoyelle Fo., Sternberg D., Jardel C., Eliot M.-M., Bouccara D., Weil D., Garabédian Ea-Nl., Couderc Rm., Petit C. & Marlin S. (2002) Two large French pedigrees with non syndromic sensorineural deafness and the mitochondrial DNA T7511C mutation : evidence for a modulatory factor. *Eur. J. Hum. Genet.*, 10, 851-856.

Cohen-Salmon M., Ott T., Michel V., Hardelin J.-P., Perfettini I., Eybalin M., Wu T., Marcus D.C., Wangemann P., Willecke K. & Petit C. (2002) Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr. Biol.*, 12, 1106-1111.

Coimbra R.S., Weil D., Brottier P., Blanchard S., Levi M., Hardelin J.-P., Weissenbach J. & Petit C. (2002) A subtracted cDNA library from the zebrafish (*Danio rerio*) embryonic inner ear. *Genome Res.*, 12, 1007-1011.

El-Amraoui A., Schonn J.-S., Küssel-Andermann P., Blanchard S., Desnos C., Henry J.-P., Wolfrum U., Darchen F. & Petit C. (2002) MyRIP, a novel Rab effector, enables myosin VIIa recruitment to retinal melanosomes. *EMBO Reports*, 3, 463-470.

Medlej-Hashim M., Mustapha M., Chouery E., Weil D., Parronau J., Salem N., Delague V., Loiselet J., Lathrop M., Petit C. & Mégarbané A. (2002) Non-syndromic recessive deafness in Jordan : mapping of a new locus to chromosome 9q34.3 and prevalence of DFNB1 mutations. *Eur. J. Hum. Genet.*, 10, 391-394.

Mirghomizadeh F., Pfister M., Apaydin F., Petit C., Kupka S., Pusch C.M., Zenner H.P. & Blin N. (2002) Substitutions in the conserved C2C domain of otoferlin cause DFNB9, a form of nonsyndromic autosomal recessive deafness. *Neurobiol. of Disease*, 10, 157-164.

Mustapha M., Chouery E., Chardenoux S., Naboulsi M., Paronnaud J., Lemainque A., Mégarbané A., Loiselet J., Weil D., Lathrop M. & Petit C. (2002) DFNB31, a recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 9q32-34. *Eur. J. Hum. Genet.*, 10, 210-212.

Mustapha M., Chouery L., Torchard-Pagnez D., Nouaille S., Kraiss A., Sayeg F.N., Mégarbané A., Loiselet J., Lathrop M., Petit C. & Weil D. (2002) A novel locus for Usher syndrome type I, USH1G, maps to chromosome 17q24-25. *Hum. Genet.*, 110, 348-350.

Ouyang X.M., Xia X.J., Verpy E., Du L.L., Pandya A., Petit C., Balkany T., Nance W.E. & Liu X.-Z. (2002) Mutations in the alternatively spliced exons of *USH1C* cause non-syndromic recessive deafness. *Hum. Genet.*, 111, 26-30.

Soussi-Yanicostas N., de Castro F., Julliard A.K., Perfettini I., Chédotal A. & Petit C. (2002) Anosmin-1, defective in the X-linked form of Kallmann syndrome, promotes axonal branch formation from olfactory bulb output neurons. *Cell.*, 109, 217-228.

Zwaenepoel I., Mustapha M., Leibovici M., Verpy E., Goodyear R., Liu X.-Z., Nouaille S., Nance W.E., Kanaan M., Avraham K.B., Tekaiia F., Loiselet J., Lathrop M., Richardson G. & Petit C. (2002) Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 99, 6240-6245.

### 2003

Bruzzo 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., Siemerling 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 *DFNB1* 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., Cribrier 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., Delpéch 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 D.N. (ed) *Nature Encyclopedia of the Human Genome*. London, UK : Nature Publishing Group, pp 1065-1071.

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., Chardenoux S., Armenta D., Lathrop M., Petit C. & Moreno F. (2003) A novel locus



for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (DFNA44) maps to chromosome 3q28-29. *Hum. Genet.*, 112, 24-28.

Modamio-Hoybjor 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 chromosome 7q31-q32 between the DFNB17 and DFNB13 deafness loci. *J. Med. Genet.* (sous presse).

Moreno-Pelayo M.A., Modamio-Hoybjor 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.* (sous presse).

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.

#### SÉMINAIRES ET CONFÉRENCES SUR INVITATION

**First Institut Pasteur Colloquium on Biological Sciences in the 21st Century** « *From the Operon, mRNA and Allostery to Integrative Biology* », 19-21 mars 2002

« Unravelling the sensory systems : contribution of human hereditary defects »

**Journées Franco-Polonaises d'ORL**, Varsovie, Pologne, 19-20 avril 2002

« Génétique de la surdité »

**The 36th Karolinska Institutet Nobel Conference** « *To Restore Hearing* », Krusenbergl, Sweden, 10-13 juin 2002

« Pathogenesis of deafness caused by connexin26 or connexin30 gene defects ».

« *Synthèse* : Concluding session at Nobel Forum »

**Neurosciences - Federation of the European Neurosciences Societies (FENS)** Paris, 13-17 juillet 2002

« Human hereditary deafness : from genes to inner ear physiology »

**Rencontre IPSEN en ORL 14<sup>e</sup> Séminaire Ophtalmologique**, Royaumont, 15-16 octobre 2002

*Conclusion/Synthèse* : « Post-génome et au-delà ... »

**Physiological Society Symposium « Building Hearing »**, University College London, Londres, GB, 18 décembre 2002

« Human hereditary deafness : from genes to pathogenesis »

**Action Concertée Incitative du Ministère de la Recherche « Biologie du Développement et physiologie intégrative »**, Collège de France, 24-25 janvier 2003

« Genetic approach of the functioning of the auditory sensory cells »

**Annual March of Dimes Clinical Genetics Conference** — American College of Medical Genetics, San Diego, USA, 13-16 mars 2003

Samuel Pruzansky Memorial Lecture « Hereditary sensory defects : from genes to pathogenesis »

**European Society of Human Genetics Conference**, Birmingham, GB, 3-6 mai 2003

« Human hereditary deficits : an unravelling of the sensory systems »

**Commémoration du centenaire du prix Nobel de Marie Curie « Les femmes dans la science »**, Institut Français, Bilbao, Espagne, 29 mai 2003

« Surdités : la part de l'hérédité. Comment les gènes impliqués contribuent à la compréhension du fonctionnement de l'oreille interne »

**Conférence Jacques Monod « Form and Function in Development and Disease »**, La Londe-les-Maures, 14-18 juin 2003

« Building the hair bundle via deafness genes »

**Course in Medical and Experimental Mammalian Genetics**, Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA, 18-21 juillet 2003

« Development and functioning of the cochlea, the auditory sensory organ : Genetic approaches »

**Gordon Conference « Mechanotransduction and Gravity Signaling in Biological Systems »**, Connecticut College, New London, USA, 21-25 juillet 2003

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

**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 »

## ENSEIGNEMENT

*1. Enseignement au titre du Collège de France***Leçon inaugurale : Génétique et Physiologie Cellulaire, 10 octobre 2002****1.a. Cours au Collège de France (7 heures) Les jeudis 24 octobre, 7, 14 et 21 novembre 2002****INTRODUCTION À LA TRANSDUCTION MÉCANO-ÉLECTRIQUE AUDITIVE**

De l'anémone de mer à l'oreille des mammifères

**1.b. Cours à l'étranger :**• **TUNIS — Tunisie (3 heures)**

8 mars 2003 — Institut Pasteur de Tunis — Invitants : Pr H. AYADI, Faculté de Médecine de Sfax &amp; Pr K. DELLAGI, Institut Pasteur de Tunis

**« Cellules sensorielles auditives : approches génétique de la physiologie de la touffe ciliaire »**• **HO CHI MINH VILLE — Vietnam (2 x 1 h 30 heure)**

10 &amp; 11 avril 2003 — Faculté de Médecine — Invitant : Pr TRUONG DINH KIET, Faculté de Médecine

**« Atteintes héréditaires de l'audition chez l'homme »****1.c. Séminaires (durée de chaque séminaire : 1 h 30)****INTRODUCTION À LA TRANSDUCTION MÉCANO-ÉLECTRIQUE AUDITIVE**

En relation avec le cours

**Maurice KERNAN (20 mars 2003)**

Dept Neurobiology &amp; Behavior, State University of New York at Stony Brook, USA

**« Cilia, channels and mechanosensory transduction in Drosophila »****Cornelius KROS (27 mars)**

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

**« Mechanotransduction by normal and mutant mouse auditory hair cells »****Paul AVAN (3 avril)**

Laboratoire Biophysique Sensorielle, Faculté de Médecine, Clermont-Ferrand, France

**« Mécanotransduction auditive et nonlinéarités acoustiques »****Robert FETTIPLACE (3 avril)**

Dept of Physiology, University of Wisconsin Medical School, Madison, USA

**« Calcium control of the mechanotransduction channel of auditory hair cells »****Jonathan ASHMORE (24 avril)**

Department of Physiology, University College, London, UK

**« The biophysics of the cochlear partition »**

**Martin CHALFIE (15 mai)**

Department of Biological Sciences, Columbia University, Columbia, USA  
 « **Mechanosensation in *C. elegans*** »

**Patricia MIRE (22 mai)**

Department of Biology, University of Louisiana, Lafayette, USA  
 « **Mechanotransduction of hair cells in an ancient invertebrate** »

**Richard WALKER (22 mai)**

Hearing Research Center & Vollum Institute, Oregon University, Portland, USA  
 « **Drosophila mechanotransduction** »

2. *Enseignement au titre de l'École Doctorale G2ID*

**DEA Génétique Moléculaire des Maladies du Développement et de l'Oncogénèse**, Université Paris V, 28 novembre 2002

« Surdités héréditaires »

3. *Diffusion des connaissances*

**France-Culture** « Archipel Sciences », 12 décembre 2002 (invitée par Stéphane Deligeorges)

**France-Culture**, entretien avec Christine Goémé, 13 décembre 2002

**France-Culture** « L'éloge du savoir » (Christine Goémé) : 20 janvier 2003, retransmission de la leçon inaugurale ; 21-23 janvier, 3-6 mars et 24-25 avril, retransmission des cours

**Colloque du Centre National des Programmes**, Ministère de l'Éducation Nationale, « *Réussir avec les sciences — L'enseignement des sciences : désamour ou malentendu* », Collège de France, 25 avril 2003 (invitée par Jean-Didier Vincent, MEN)

« Le métier de chercheur »

4. *Rencontres avec les associations de patients*

**Journée Rétina-France**, Faculté de Médecine Necker-Enfants Malades, 16 novembre 2002

« Bases moléculaires du syndrome de Usher »

**Journée de l'Association SURDI 13 de Défense des Devenus Sourds et Malentendants**, Palais des Congrès, Aix-en-Provence, 18 janvier 2003

« La recherche médicale sur les surdités : quel espoir ? »

**Réunion annuelle du BUCODES** (fédération d'associations de malentendants et devenus sourds), Paris, 1<sup>er</sup> février 2003

« Les surdités héréditaires »

**Journée Rétina-France**, Poitiers, 27 septembre 2003

« Syndrome de Usher : avancées dans la compréhension de la pathogénie »

## CHERCHEURS DU LABORATOIRE

**Séminaires, conférences****Martine Cohen-Salmon**

ARO (Association for Research in Otolaryngology) Midwinter Meeting, Saint-Petersbourg, USA ; 27-31 janvier 2002

« Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and massive/cell apoptosis »

(& Vincent Michel, Jean-Pierre Hardelin, Isabelle Perfettini, Christine Petit)

Séminaire, laboratoire de Daniel Gros, Marseille ; janvier 2003

« Rôle des jonctions gap dans l'oreille interne : une approche génétique »

Séminaire, laboratoire de Paolo Meda, Université de Genève, Suisse ; janvier 2003

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

International Gap junction conference Cambridge, UK, août 2003

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

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**

Neurosciences - Federation of the European Neurosciences Societies (FENS) ; Paris ; 13-17 juillet 2002

« An interaction between myosin VIIA and Rab27a mediated by MyRIP (myosin VIIA and Rab Interacting Protein) » (poster)

ARO (Association for Research in Otolaryngology) Midwinter Meeting, Daytona Beach, USA ; 22-27 février 2003

« Towards a molecular understanding of Usher type I syndrome : the quest of myosin VIIa, harmonin, and cadherin 23 ligands »

**Jean-Pierre Hardelin**

Journée de l'Institut de Biologie « *Transduction de Signaux. Molécules à Action Centrale et Périphérique* » ; Collège de France, Paris ; 8 novembre 2002

« Une approche génétique du rôle des jonctions intercellulaires communicantes de l'oreille interne »

Association Canaux Ioniques — 14<sup>e</sup> colloque, Presqu'île de Giens ; 21-24 septembre 2003

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

**Vincent Michel**

Neurosciences - Federation of the European Neurosciences Societies (FENS), Paris ; 13-17 juillet 2002

« Targeted ablation of connexin-26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and massive cell death » (poster)

(& Martine Cohen-Salmon, Jean-Pierre Hardelin, Isabelle Perfettini, Christine Petit)

### **Saaïd Safieddine**

Action Concertée Incitative du Ministère de la Recherche « *Biologie du Développement et physiologie intégrative* » ; Collège de France ; 24-25 janvier 2003

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

(& Isabelle Roux, M'hamed Grati, Christine Petit)

### **Enseignement**

#### **Aziz El-Amraoui**

DEA de Génétique Humaine : Université Pierre & Marie Curie (Paris 6) en 2002 et en 2003, Éd. « Logique du Vivant ».

« Bases moléculaires du syndrome de Usher »

#### **Jean-Pierre Hardelin**

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

« Audition : Différents mécanismes d'analyse des fréquences sonores »

#### **Maîtrise de Génétique Humaine (Paris VI)**

Un cours de 4 h en 2002 et en 2003

« Bases moléculaires des surdités héréditaires chez l'homme »

#### **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)

### **Diplômés**

*Nadia Soussi-Yanicostas* : Habilitation à Diriger les Recherches, Université Paris VI, soutenue le 29 avril 2003

*Batiste Boëda* : « Formation de la touffe ciliaire des cellules sensorielles auditives : approche génétique fondée sur l'étude de surdités héréditaires humaines et murines », thèse de l'Université Paris VI (Génétique, École Doctorale Logique du Vivant), soutenue le 22-1-2003

*Raphaël Etournay* : « La touffe ciliaire, structure mécano-réceptrice de la cellule sensorielle auditive : composants et interactions moléculaires », DEA

Approches Structurale, Fonctionnelle et Évolutive des Génomes, École Doctorale Genes, Genomes, Cellules (GGC), Université Paris XI-Orsay, juillet 2003

*Aurore Marcolla* : « Surdité liée à l'atteinte du gène *OTOF* :   pid  miologie et aspects fonctionnels », DEA Génétique Moléculaire des Maladies du Développement et de l'Oncogénèse, Université Paris V, juillet 2003

***Chercheurs post-doctorants***

*Avital Adato*, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israël

*Francisco del Castillo*, Unidad de Gen  tica 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

***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

*Er  a-Noël Garabédian*, Professeur, ORL