

Les mécanismes de la neuropathie auditive AUNA1

Clément Surel

▶ **To cite this version:**

Clément Surel. Les mécanismes de la neuropathie auditive AUNA1. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTT093 . tel-01560972

HAL Id: tel-01560972
https://theses.hal.science/tel-01560972

Submitted on 12 Jul 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Collège Doctoral du Languedoc-Roussillon

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur

Délivré par **l'Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale

Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

et de l'unité de recherche

INSERM U1051

Institut des Neurosciences de Montpellier

Spécialité : **Neurosciences**

Présentée par **Clément Surel**

Les mécanismes de la neuropathie auditive AUNA1

Soutenue le 19.12.2016 devant le jury composé de

M. Salah EL-MESTIKAWY (président du jury) Directeur de recherche, Institut de Biologie Paris-Seine	Rapporteur
Mme Brigitte MALGRANGE Directrice de recherche, Université de Liège	Rapporteur
Mme Sandrine MARLIN Praticienne hospitalière, Hôpital Necker, Paris	Examinateur
M. Jean-Luc PUEL Professeur des universités, Institut des Neurosciences de Montpellier	Co-directeur de thèse
M. Régis NOUVIAN Chargé de recherche, Institut des Neurosciences de Montpellier	Co-directeur de thèse

Université de Montpellier

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur de thèse Régis Nouvian d'avoir accepté d'être mon mentor durant cette aventure. De m'avoir appris tant de choses, autant sur le plan professionnel que personnel. D'avoir été toujours présent pour m'apporter son aide et ses conseils. Et de m'avoir encouragé du début à la fin. Je lui suis entièrement reconnaissant de son investissement, de sa confiance, de sa disponibilité, de son soutien sans faille et surtout de son amitié.

Je remercie Jean-Luc Puel de m'avoir intégré dans son équipe, de m'avoir permis d'assister et de participer aux différents congrès et d'avoir porté autant d'intérêt à mon travail et à ma carrière professionnelle.

Je remercie toutes les personnes qui ont apporté leur contribution de peu ou de loin à mon projet de thèse.

Un grand merci à Marie Guillet d'avoir porté avec moi ce beau projet. De m'avoir appris la technique d'immunomarquage sur la cochlée et la microscopie confocale. Merci surtout pour sa gaîté et sa générosité qui ont marqué tous les bons moments que nous avons eus ensemble, que ce soit au laboratoire ou en dehors.

Merci à Gaston Sendin. Pour son aide et ses conseils. Pour son optimisme, son humour et ses échanges toujours intéressants qui font de lui un excellent ami.

Merci à Jérôme Bourien. Pour le travail qu'il a fourni sur le projet. Et surtout pour ce dynamisme et cette bonne humeur ! Je garderai de très bons souvenirs des congrès et de tous les moments que nous avons passés ensemble. Je le remercie également pour tous ses encouragements qui m'ont donné confiance en mon travail.

Merci à Marc Lenoir pour son travail et ses très belles images. Pour m'avoir montré le principe de la microscopie électronique et fait découvrir le microscope à balayage. Pour toutes ses remarques constructives sur le projet et ses encouragements.

Et merci à Willy Joly pour son aide et ses nombreux conseils en biologie moléculaire.

Je remercie les membres de mes comités de suivie de thèse, Anne Debant, Salah El-Mestikawy et Cédric Raoul. Merci à eux pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, leurs conseils et leurs encouragements.

Je remercie Brigitte Malgrange, Sandrine Marlin et Salah El-Mestikawy d'avoir accepté de juger ce travail et d'être membre de mon jury de thèse.

Je remercie Alain Garcès pour l'enseignement qu'il m'a donné au cours de mes deux années de master. Pour cette passion qui l'anime et qu'il m'a fait partager.

Je remercie Patrick Carroll de m'avoir accueilli dans son équipe durant mon master.

Et merci aux membres de l'équipe 3 pour leur convivialité. Et pour leurs précieux conseils qui ont joué un rôle important dans la réussite de mon master et de mon doctorat.

Merci à Florian Hasselmann pour son amitié, son humour et tous ces échanges que nous avons eus entre cinéphiles.

Merci à Piotr Kazmierczak pour ses conseils et sa conversation enrichissante.

Un immense merci à Yulia Korchagina et Marine Chazalon, mes amies proches et confidentes! Pour leur amour, leur présence, leur soutien et leur réconfort.

Enfin, je remercie toutes les personnes, au sein de l'équipe 2 ou au sein de l'INM, avec qui j'ai pu avoir des échanges et partagé au quotidien des petit moments de plaisir et de joie.

Sommaire

1. Introduction 8

2. Les neuropathies auditives 11

2.1. Transfert de l'information sonore 12

2.1.1. Anatomie de l'oreille 12

2.1.1.1. Anatomie de l'oreille externe, moyenne et interne 12

2.1.1.2. Anatomie de l'organe de Corti 15

2.1.1.3. L'appareil mécanotransducteur des CCI 16

2.1.1.4. Les stéréocils 18

2.1.1.5. La plaque cuticulaire 19

2.1.2. Physiologie de la cochlée 27

2.2. Synaptopathies auditives 28

2.2.1. Organisation de la synapse à ruban 28

2.2.2. La synaptopathie auditive DFNB9 31

2.2.3. La synaptopathie auditive DFNA25 33

2.2.4. La synaptopathie auditive SAAND 35

2.2.5. La synaptopathie auditive DFNB93 36

2.2.6. La synaptopathie auditive due à l'exposition au bruit 36

2.3. Neuropathies auditives 37

2.3.1. Les neuropathies auditives associées aux mutations du gène *OPA1* 37

2.3.2. La neuropathie auditive AUNX1 38

2.4. Myélinopathies auditives 39

2.4.1. Les myélinopathies auditives associées aux neuropathies sensorimotrices 39

2.5. Cellulopathies auditives 40
2.5.1. La cellulopathie auditive chez le bébé prématuré 40
2.5.2. La cellulopathie auditive due à une carence en thiamine 40
2.5.3. La cellulopathie auditive AUNA1 41
3. Matériel et méthodes 44
3.1. Animaux 45
3.2. Tampons et solutions 46
3.3. Anticorps 47
3.4. Génotypage 47
3.5. Enregistrements in-vivo 48
3.5.1. Enregistrements des Potentiels évoqués auditifs (PEA) 49
3.5.2. Enregistrements des produits de distorsion acoustiques 49
3.5.3. Electrococléographie 50
3.6. Patch-clamp et patch perforé 51
3.6.1. Enregistrement des courants potassiques et du potentiel de membrane 51
3.6.2 Enregistrement des courants calciques et de la capacité membranaire 52
3.7. Microscopie électronique 53
3.7.1 Préparation des cochlées 53
3.7.2 Microscopie électronique à balayage 53
3.7.2 Microscopie électronique à transmission 54
3.8. Immunomarquages 54
3.9. Test de la spécificité de l'anticorps anti-Diap3 55
3.9.1. Culture des cellules HEK 55
3.9.2. Plasmides 56
3.9.3. Transfection et extraction des protéines 56
3.9.4. Western Blot 57

4. Résultats 58
4.1. Les souris Diap3-Tg miment la neuropathie auditive AUNA1 59
4.2. Perte d'activité des CCI chez les souris Diap3-Tg 60
4.3. L'activité synaptique des CCI des souris Diap3-Tg est normale 62
4.4. Les courants K^+ des CCI des souris Diap3-Tg ne sont pas perturbés 64
4.5. Une fusion des stéréocils est à l'origine de la perte d'activité des CCI des souris Diap3-Tg 66
4.6. Déformation de la plaque cuticulaire des CCI des souris Diap3-Tg 69
4.7. Remodelage du réseau de microtubule dans les CCI des souris Diap3-Tg 70
4.8. La réorganisation des microtubules dans les CCI des souris Diap3-Tg commence avant l'apparition de la surdité 75
4.9. Diap3 est localisée dans la plaque cuticulaire des CCI 77
5. Discussion 79
5.1. Remodelage du réseau de microtubule dans les CCI des souris Diap3-Tg 80
5.2. La surexpression de *Diap3* perturbe la mécanotransduction des CCI 82
5.3. L'atteinte spécifique des CCI 83
5.4. Les souris Diap3-Tg miment la neuropathie auditive humaine AUNA1 86
5.5. Conclusion 87
6. Références 88
7. Manuscript 99

1. Introduction

Les neuropathies auditives forment une classe de surdités qui se caractérisent par des potentiels évoqués auditifs absents ou désynchronisés et des otoémissions acoustiques normales. Ces caractéristiques cliniques traduisent une atteinte des cellules ciliées internes (qui détectent les ondes sonores et les transforment en message nerveux) et/ou des neurones afférents primaires (qui véhiculent les messages nerveux jusqu'au noyau cochléaire), associée à une activité normale des cellules ciliées externes (qui amplifient les ondes sonores) (Starr et al., 1996).

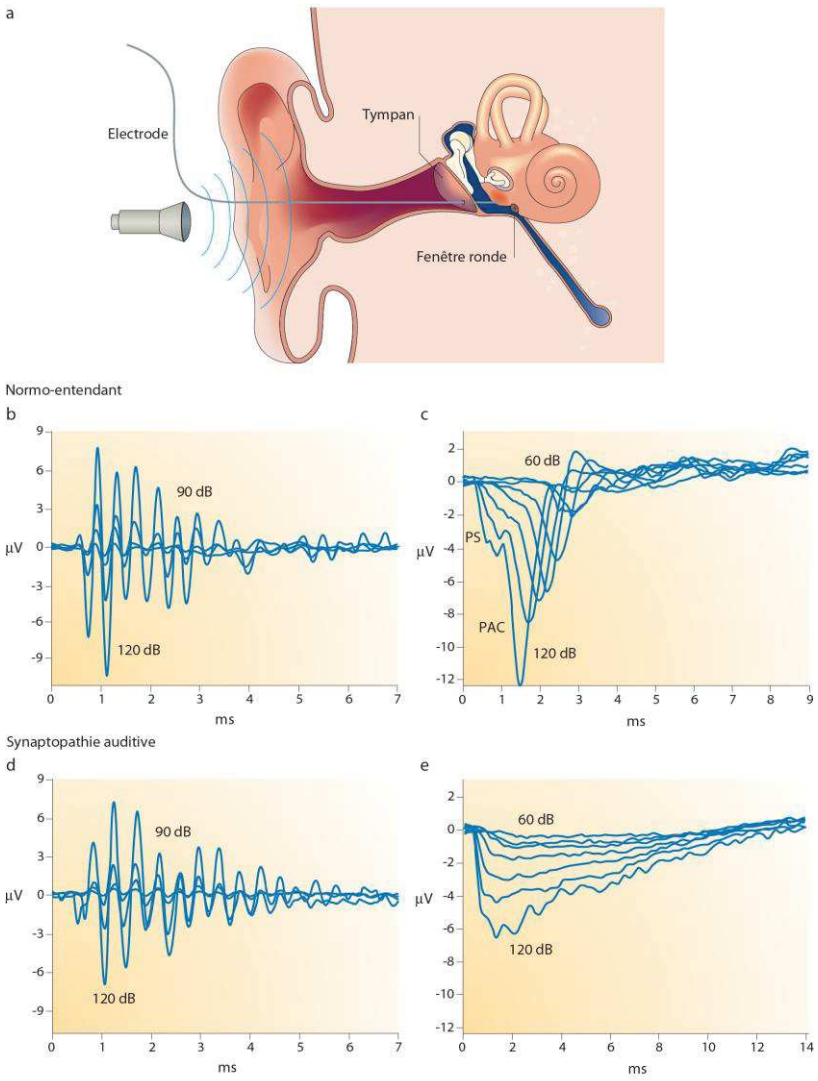


Figure 1.1 : Caractéristiques cliniques d'une neuropathie auditve. (**a**) La technique d'électrocochléographie permet de déceler les neuropathies auditives. Une électrode est insérée dans le canal auditif et posée sur la fenêtre ronde de la cochlée. Le potentiel cochléaire global, qui reflète l'activité électrique de la cochlée, est enregistré en présence d'un stimulus sonore. (**b-e**) Le potentiel cochléaire global comprend le potentiel microphonique qui reflète l'activité des cellules ciliées externes (b, d), le potentiel de sommation (PS) qui réflète l'activité des cellules ciliées internes (c, e), et le potentiel d'action composite (PAC) qui reflète l'activité des neurones afférents primaires (c, e). Le potentiel microphonique des sujets atteints de neuropathie auditive (d) est similaire à celui des sujets normo-entendants (b). En revanche, le potentiel d'action composite, présent chez les sujets normo-entendants (c), n'est pas détecté chez les patients atteints de neuropathie auditive (e). Enfin, selon le type de neuropathie auditive, le potentiel de sommation peut être présent (e) ou absent. Image tirée de Moser et Starr, 2016.

AUNA1 (*Auditory Neuropathy 1*) est la première neuropathie auditive héréditaire à avoir été décrite (Starr et al., 2004). Elle est causée par une mutation ponctuelle dans le promoteur du gène *Diaphanous homolog 3* (*DIAPH3*) qui induit une surexpression de *DIAPH3* (Schoen et al., 2010). La protéine DIAPH3 appartient à la famille des formines, une classe de protéines ubiquitaires impliquées dans la régulation du cytosquelette (Bartolini et Gundersen, 2010; Kuhn et Geyer, 2014). Les fonctions spécifiques de DIAPH3 sont la nucléation et l'élongation des filaments d'actine ainsi que la stabilisation des microtubules. Pour étudier les mécanismes de la surdité AUNA1, l'équipe du Dr Marci Lesperance, à l'université du Michigan, a généré un modèle murin transgénique surexprimant le gène *Diap3*, l'orthologue murin de *DIAPH3* (Schoen et al., 2013). Chez les souris transgéniques (Diap3-Tg), on note une élévation des seuils auditifs et une amplitude normale des produits de distorsions acoustiques (qui reflètent l'activité des cellules ciliées externes). Ces résultats montrent donc que les souris Diap3-Tg reproduisent la neuropathie auditive humaine AUNA1. Des défauts morphologiques furent observés dans les cellules ciliées internes des souris Diap3-Tg, cependant les mécanismes moléculaires à l'origine d'AUNA1 restaient indéterminés (Schoen et al., 2013).

L'objectif de ma thèse était d'identifier les mécanismes responsables de la neuropathie auditive AUNA1. Pour ce faire, j'ai étudié le phénotype des souris Diap3-Tg à l'aide d'une approche multidisciplinaire. Mes résultats montrent un remaniement massif et précoce du réseau de microtubules à l'origine de la surdité AUNA1. Au-delà d'une meilleure compréhension d'AUNA1, les résultats obtenus soulignent la diversité des mécanismes pouvant conduire à une neuropathie auditive.

2. Les neuropathies auditives

Selon l'Organisation mondiale de la Santé, les déficits auditifs touchent 360 millions d'individus à travers le monde, soit 5% de la population mondiale[1]. Les traitements actuels pour venir en aide aux personnes sourdes et malentendantes sont les appareils auditifs, les implants cochléaires et la microchirurgie (utilisée dans les cas de surdité dus à une atteinte de l'oreille moyenne). Malheureusement, dans de nombreux cas, ces solutions sont insuffisantes voire inefficaces pour retrouver une audition satisfaisante. De nouvelles stratégies telles que la pharmacologie, la thérapie cellulaire ou la thérapie génique sont en cours de développement pour offrir à l'avenir de meilleurs traitements. Mais ces stratégies nécessitent une connaissance approfondie des mécanismes responsables des déficits auditifs.

2.1. Transfert de l'information sonore

2.1.1. Anatomie de l'oreille

2.1.1.1. Anatomie de l'oreille externe, moyenne et interne

L'oreille se divise en trois parties : l'oreille externe, moyenne et interne. L'oreille externe se compose du pavillon et du conduit auditif, et a pour fonction de capter les sons. L'oreille moyenne comprend le tympan et les trois osselets (marteau, enclume étrier) et adapte l'impédance entre le milieu aérien et liquidien. Enfin, l'oreille interne est constituée de deux organes : le vestibule, organe sensoriel de l'équilibration, et la cochlée, organe périphérique de l'audition qui assure la transformation des ondes sonores en message nerveux (Fig. 2.1).

[1] *Fact sheet N°300* : http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/

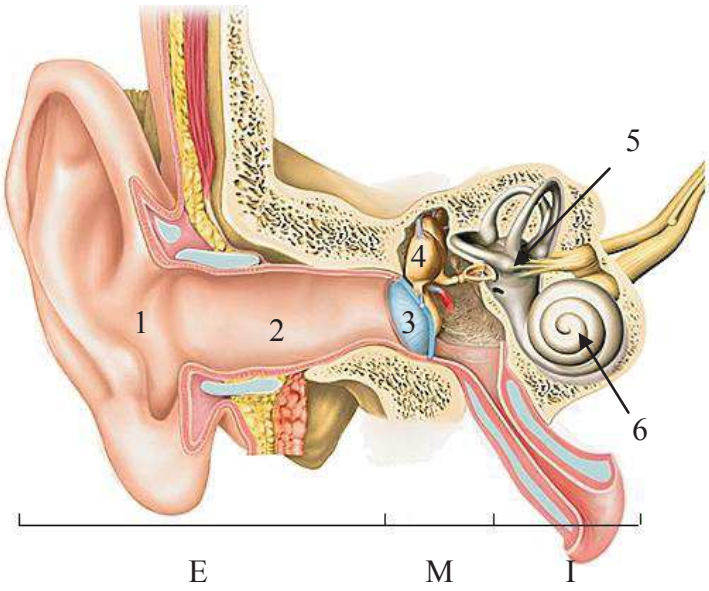


Figure 2.1 : Le système auditif périphérique. Le système auditif périphérique se divise en trois parties : l'oreille externe (E), l'oreille moyenne (M) et l'oreille interne (I). L'oreille externe est formée par le pavillon (1) et le conduit auditif externe (2). L'oreille moyenne, située entre le tympan (3) et la cochlée (6), assure grâce à la chaîne des osselets (4) un rôle d'adaptateur d'impédance entre le milieu aérien et le milieu liquidien. L'oreille interne est formée de deux organes distincts : le vestibule (5), l'organe sensoriel de l'équilibration et la cochlée (6), l'organe neuro-sensoriel de l'audition, dont la forme évoque celle d'un escargot.

La cochlée est recouverte d'une paroi osseuse, la capsule optique, et renferme trois canaux (la rampe vestibulaire, le canal cochléaire et la rampe tympanique) enroulés autour d'un axe central, le modiolius. Ces canaux sont remplis de liquides physiologiques : la rampe tympanique et la rampe vestibulaire contiennent la périlymphe, un milieu riche en sodium, et le canal cochléaire contient l'endolymphe, un milieu riche en potassium. A la base de la cochlée, se trouve une ouverture dans la capsule optique, la fenêtre ovale, sur laquelle repose l'étrier, et qui marque l'entrée de la rampe vestibulaire. La rampe vestibulaire communique avec la rampe tympanique au niveau de l'hélicotrème situé à l'apex de la cochlée. La rampe tympanique rejoint la base de la cochlée jusqu'à une deuxième ouverture de la capsule optique, la fenêtre ronde. Le canal cochléaire est situé entre la rampe vestibulaire et la rampe tympanique. A l'intérieur du canal cochléaire, se trouve un épithélium neurosensoriel, l'organe de Corti, qui repose sur la membrane basilaire.



Figure 2.2 : La spirale cochléaire. Vue en microscopie électronique à balayage de la spire cochléaire d'une cochlée de rat. L'enroulement caractéristique de cet organe est nettement visible. Ici, la capsule otique, la strie vasculaire et la membrane tectoriale ont été délicatement enlevées, dévoilant l'organe de Corti. La partie située en bas de l'image correspond à la zone d'attache de la cochlée à l'os temporal et porte le nom de base. C'est également dans cette zone, à l'extrémité inférieure de la spirale, que se trouvent les deux fenêtres. Le sommet de la spirale porte, quant à lui, le nom d'apex. Barre d'échelle : 2 mm.
Photo : Marc Lenoir.

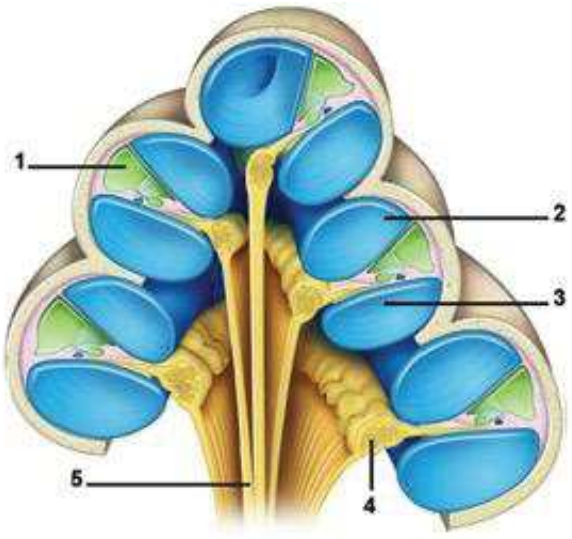


Figure 2.3 : Section axiale de la cochlée. Cette figure représente une section axiale (ou modiolaire, c'est à dire passant par le modiolus) de la cochlée. Elle montre de façon schématique l'enroulement des trois canaux de la cochlée : le canal cochléaire (1), contenant l'endolymphe, et les rampes vestibulaires (2) et tympaniques (3), formant le compartiment périlymphatique. La partie centrale de la cochlée (le modiolus) contient le ganglion spiral (4), où se trouvent les corps cellulaires des neurones auditifs primaires, et les fibres du nerf auditif (5) reliés aux structures du tronc cérébral.
Schéma : Pujol et al.,
http://www.cochlea.eu/cochlee.

2.1.1.2. Anatomie de l'organe de Corti

L'organe de Corti est composé de différents types de cellules, dont les cellules ciliées qui sont les cellules sensorielles de la cochlée. Ce sont des cellules épithéliales caractérisées par des expansions cytoplasmiques riches en actine, les stéréocils, émergeant de leur pôle apical. Il existe deux populations de cellules ciliées : les cellules ciliées externes (CCE) qui sont organisées en trois rangées le long de l'organe de Corti, et les cellules ciliées internes (CCI) organisés sur une seule rangée. La membrane tectoriale, une matrice acellulaire composée de collagène et de tectorine (Legan et al., 2000) coiffe les cellules ciliées. Les stéréocils des CCE sont ancrés dans la membrane tectoriale. Les CCI sont innervées par les fibres afférentes de types I, qui forment le ganglion spiral et projettent vers le noyau cochléaire. Les CCE sont innervées par les fibres de type II, qui forment une population minoritaire au sein du ganglion spiral : elles constituent en effet à peine 5 % de la population neuronale de cette structure.

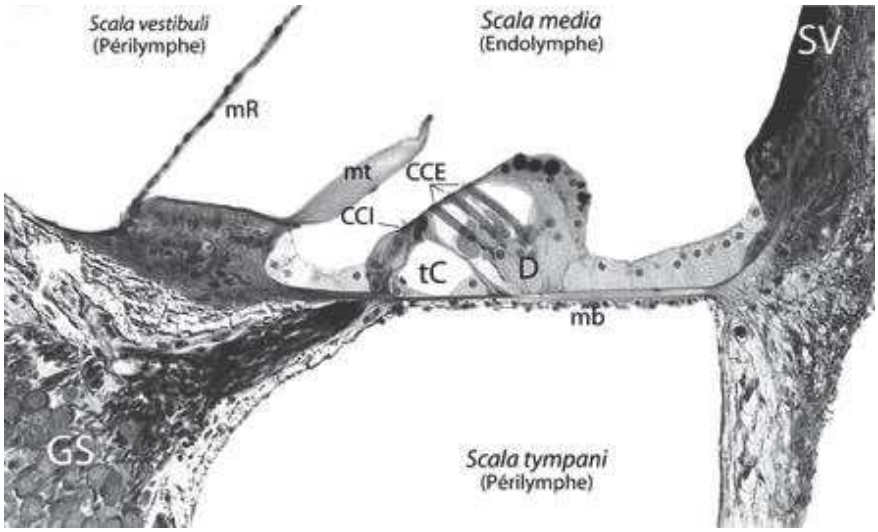


Figure 2.4 : Section transversale d'un tour de spire de la cochlée. Coupe transversale effectuée au niveau du troisième tour d'une cochlée de cobaye visualisée en microscopie électronique à balayage. Dans l'organe de Corti, la rangée de cellules ciliées internes (CCI) et les trois rangées de cellules ciliées externes (CCE) sont disposées de part et d'autre du tunnel de Corti (tC). Les CCE, dont la base repose sur les cellules de Deiters (D), modulent la transduction par des processus mécaniques actifs. Ceux-ci amplifient les mouvements de la membrane basilaire (mb) en un point précis dépendant de la fréquence, facilitant la stimulation des CCI et permettant l'envoi vers le cerveau d'un message bioélectrique finement accordé. mR : membrane de Reissner ; mt : membrane tectoriale; SV : Strie Vasculaire. GS : ganglion spiral. Barre d'échelle : 100 µM. Photo : Marc Lenoir (Inserm U1051).

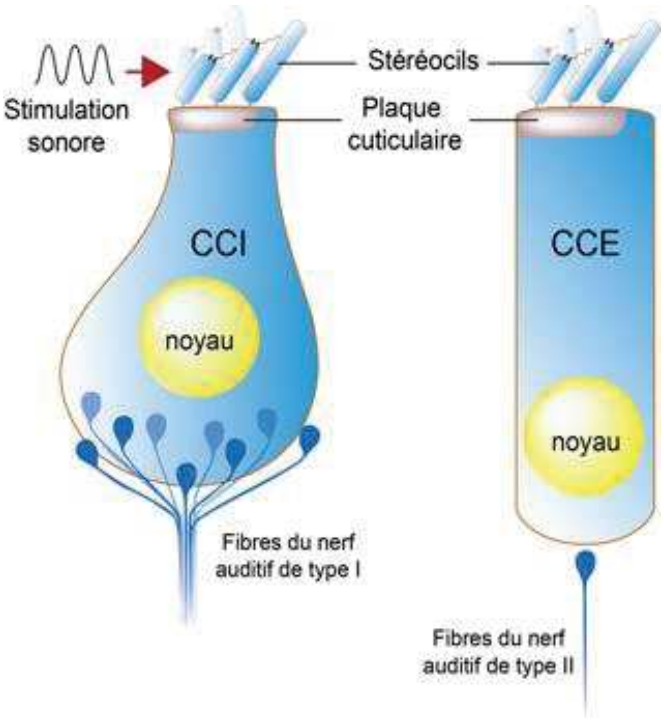


Figure 2.5 : Représentation schématique des cellules ciliées. Gauche : Cellule ciliée interne (CCI). Droite : Cellule ciliée externe (CCE). Les cellules ciliées sont dotées d'un faisceau de stéréocil qui détecte les ondes sonores. Les stéréocils sont ancrées dans la plaque cuticulaire, une structure riche en actine et sont reliées entre eux par des filaments appelés tip-link. L'extrémité de chaque tip-link est connectée à un canal sensible à l'étirement. En réponse à une stimulation sonore, le canal mécano-transducteur s'ouvre et permet l'influx de cations, principalement du potassium et du calcium en raison de la composition de l'endolymphe (seuls les stéréocils baignent dans l'endolymphe, le corps cellulaire des CCI et CCE baigne dans la périlymphe). L'entrée de cations dépolarise alors les CCI et CCE. Tandis que 95 % des fibres du nerf auditif sont connectés avec les CCI et forment les fibres de type I, seule 5 % des fibres (de type II) projettent sur les CCE.

2.1.1.3. L'appareil mécanotransducteur des CCI

La mécanotransduction est la conversion de forces mécaniques en signaux électriques. Le faisceau de stéréocil des CCI est l'appareil mécanotransducteur du système auditif. Celui-ci permet en effet de transformer les ondes sonores en potentiel de récepteur. Le faisceau de stéréocil est composé de plusieurs rangées de stéréocil de taille décroissante. Les stérocils sont des expansions cytoplasmiques constitués d'un grand nombre de filaments d'actine extrêmement compactés (Tilney et al., 1992). Ils sont ancrés dans une plateforme, la plaque cuticulaire, qui est elle-même constituée d'un enchevêtrement de filaments d'actine. Au cours du développement, une structure semblable aux stéréocils, le kinocil, contrôle la formation et l'orientation des stéréocils. Contrairement à ces derniers, le kinocil est un véritable cil constitué de microtubules. Lors de l'entrée en fonction de la cochlée, le corps du kinocil disparait et seule sa base, appelée corps basal, reste ancrée dans la plaque cuticulaire.

Dans la partie haute des stéréocils, se trouve le canal mécanotransducteur, un canal sensible à l'étirement responsable de la génération du potentiel de récepteur (Hudspeth, 1982; Jaramillo et Hudspeth, 1991; Lumpkin et Hudspeth, 1995). Lors d'une stimulation acoustique, les ondes sonores provoquent une déflection des stéréocils. La tension exercée sur la membrane plasmique provoque alors l'ouverture du canal mécanotransducteur qui génère ainsi un potentiel de récepteur.

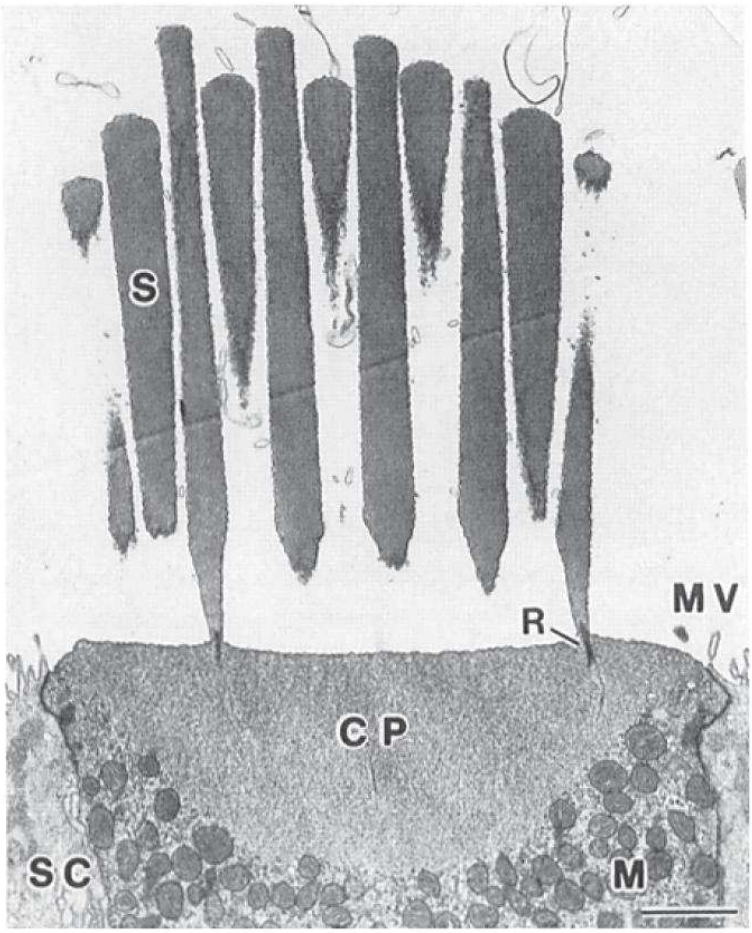


Figure 2.6 : Image de l'appareil mécanotransducteur d'une cellule ciliée auditive chez l'alligator, prise en microscopie électronique à transmission. Les stéréocils (S) sont des expansions cytoplasmiques constituées de filaments d'actine, dont la taille est largement supérieure à celle des microvillis (MV). Chaque stéréocil forme une racine (R) caractérisée par une extrême compaction d'un petit nombre de filament d'actine. Les racines s'insèrent dans la plaque cuticulaire (CP), elle-même, composée d'un enchevêtrement de filaments d'actine. Sous la plaque cuticulaire, se trouve un large contingent de mitochondries (M). SC : cellule de soutien. Barre d'échelle : 1µm. Image tirée de DeRosier et Tilney, 1989 d'après Tilney et al., 1980.

2.1.1.4. Les stéréocils

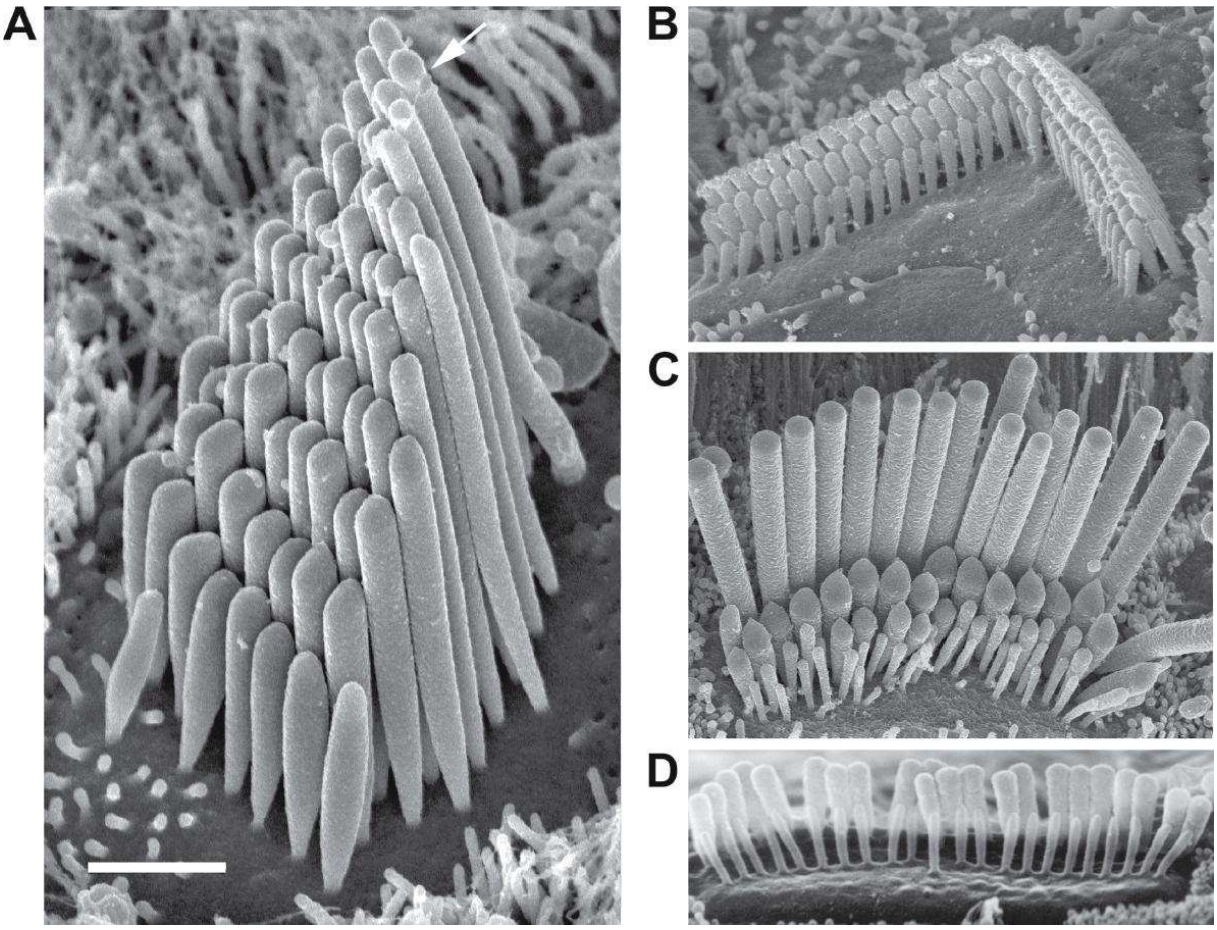


Figure 2.7 : Images de divers faisceaux de stéréocils, prises en microscocpie électronique à balayage, chez différentes espèces. (**A**) Image prise chez la tortue du faisceau de stéréocil d'une cellule ciliée auditive, composée de neuf rangées de stéréocils et d'un kinocil (flèche). (**B-C**) Images prises chez le rat des faisceaux de stéréocil d'une cellule ciliée externe (B), composé de 3 rangées de stéréocils, et d'une cellule cilié interne (C), composé de 4 rangées de stéréocils. (**D**) Image prise chez la chauve-souris du faisceau de stéréocil d'une cellule ciliée interne répondant aux hautes fréquentes, composé de deux rangées de stéréocils. Barre d'échelle : 1 µm pour A, 2 µm pour B-D. Images prises par C. M. Hackney (A, B, D) et D. N. Furness (C). Figure tirée de Fettiplace et Kim, 2014.

La composition moléculaire des stéréocils est un domaine d'étude dont l'exploration n'a débutée que très récemment. Une des questions les plus importantes est l'identité du canal mécanotransducteur. Bien que la nature de ce dernier reste encore inconnue, les données électrophysiologiques ont pu démontrer que ce canal est perméable aux cations, et notamment aux ions Ca^{2+}. On estime qu'il y aurait 2 canaux mécanotransducteurs par stéréocils (Ricci et al., 2003).

Les stéréocils sont reliés entre eux par des filaments extracellulaires, à savoir les tip-links, les lateral links et les ankles links (Bashtanov et al., 2004). Les tip-links connectent le sommet de chaque stéréocil à la partie supérieure du stéréocil voisin de plus grande taille (Pickles et al., 1984). Ils sont formés par une interaction entre la protocadhérine 25, localisée au sommet du petit stéréocil, et la cadhérine 23, localisée dans la partie supérieur du grand stéréocil (Kazmierczak et al., 2007). De part leur rigidité, les tip-links exercent une tension sur la membrane plasmique et jouent probablement un rôle essentiel dans l'ouverture du canal mécanotransducteur. Plusieurs études montrent que les agents pharmacologiques qui détruisent les tip-links abolissent également la mécanotransduction (Assad et al., 1991; Zhao et al., 1996).

2.1.1.5. La plaque cuticulaire

La plaque cuticulaire est une matrice dense, faite de filaments d'actine, qui enveloppe la racine des stéréocils. Son rôle est fort probablement de maintenir la position des stéréocils. A ce jour, la structure et la composition moléculaire de la plaque cuticulaire sont encore peu connues. La surface apicale de la plaque cuticulaire semble être en contact direct avec la membrane plasmique (Tilney et al., 1983; Liberman, 1987). Les autres bords de la plaque cuticulaire, en revanche, baignent dans le cytoplasme. Ces observations suggèrent que la plaque cuticulaire ne serait pas fortement attachée aux autres structures de la cellule ciliée et aurait ainsi une certaine liberté de mouvement. Dans les cellules ciliées vestibulaires, la déflection du faisceau de stéréocil provoque un léger déplacement réversible de la plaque cuticulaire (Valat et al., 1991; Griguer et al., 1993). Cette mobilité restreinte de la plaque cuticulaire apporterait une certaine souplesse à l'ensemble du système et protégerait ainsi les stéréocils d'éventuels dommages mécaniques.

Parmi le grand nombre de filaments d'actine (~100 filaments) qui constituent le corps d'un stéréocil, seul quelques uns traversent la base, nettemnt plus étroite que le corps, pour former la racine du stéréocil et s'insérer dans la plaque cuticulaire (Kimura, 1975; DeRosier et Tilney, 1989). Les racines de certains stéréocils traversent entièrement la plaque cuticulaire (Takasaka et al., 1983; Furness et al., 2008). Dans leur étude, Vranceanu et al. ont montré que ces racines forment un angle de 110° dans la plaque cuticulaire et ressortent de la structure pour rejoindre la membrane plasmique du côté opposé au corps basal (Vranceanu et al., 2012).

Les racines des stéréocils sont composées de β-actine, γ-actine, spectrine et tropomyosine. La protéine TRIOBP assure l'assemblage des filaments d'actine en faisceau et joue un rôle essentiel dans la formation des racines. La mutation du gène *Triobp* induit une surdité profonde chez l'homme (Riazuddin et al., 2006; Shahin et al., 2006). Chez les souris mutantes pour *Triobp*, les stéréocils se développent normalement mais ne forment pas de racine dans la plaque cuticulaire (Kitajiri et al., 2010). Ces stéréocils sont plus flexibles et se détériorent plus facilement, ce qui souligne l'importance des racines dans la rigidité et la résistance des stéréocils. Les mécanismes impliqués dans la formation des racines restent encore inconnus.

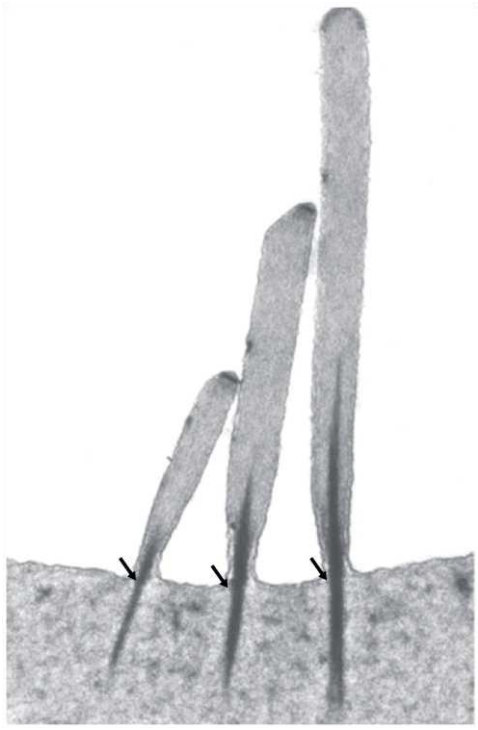


Figure 2.8 : Image de stéréocils et de leurs racines dans une cellule ciliée externe de cochon d'inde, prise en microscopie électronique à transmission. A la base des stétéocils, un petit nombre de filaments d'actines hautement compactés forme la racine, la partie du stéréocil qui est ancrée dans la plaque cuticulaire. Modifiée à partir de Fettiplace et Hackney, 2006.

Contrairement aux stéréocils, la plaque cuticulaire est constituée de filaments d'actine qui ne semblent pas avoir d'organisation précise (Liberman, 1987; DeRosier et Tilney, 1989) mais qui sont néanmoins répartis de manière homogène dans l'ensemble de la structure (Raphael et al., 1994; Szarama et al., 2012). Il semblerait que les filaments d'actine de la plaque cuticulaire ne connectent pas directement ceux des stéréocils mais se lient à eux par l'intermédiaire de filaments *linkers* (Tilney et al., 1980). En effet, des descriptions détaillées de la plaque cuticulaire ont révélées la présence de filaments dépourvus de molécules d'actine, liant la racine des stéréocils à la plaque cuticulaire (Hirokawa et Tilney, 1982; Hirokawa, 1986; Arima et al., 1987). D'autres filaments *linkers* permettent également de lier entre eux les différents filaments d'actine de la plaque cuticulaire. Enfin, de petits filaments, divisés en plusieurs branches, attachent la surface apicale de la plaque cuticulaire à la membrane plasmique. Les protéines qui constituent ces différents groupes de filaments *linkers* n'ont pas encore été identifiées.

Une structure indépendante, la bande circonférentielle, constituée de filaments d'actine parallèles, forme un cercle autour de la plaque cuticulaire. La bande circonférentielle est localisée à proximité des jonctions adhérentes qui connectent les cellules ciliées aux cellules de soutien (Hirokawa et Tilney, 1982; Seaman et al., 1994) et est séparée de la plaque cuticulaire par un espace rempli de cytoplasme (Raphael et al., 1994).

La plaque cuticulaire établit plusieurs connections avec le réseau de microtubule. Tout d'abord, le corps basal, inséré dans la plaque cuticulaire, projette des microtubules en direction du cytoplasme (Steyger et al., 1989; Sobkowicz et al., 1995). Par ailleurs, un groupe de microtubules organisés en anneau entoure la plaque cuticulaire des CCI (Furness et al., 1990; Raphael et al., 1994). Plusieurs études montrent également une insertion de microtubules en provenance du cytoplasme à l'intérieur même de la plaque cuticulaire (Jaeger et al., 1994; Antonellis et al., 2014). Des protéines *linkers* relient ces microtubules aux filaments d'actine de la plaque cuticulaire. Les protéines MAP-1A et MAP-1B, localisées aux sites d'insertion des microtubules pourraient en faire parti (Jaeger et al., 1994). Plus récemment, la protéine ACF7, connue pour connecter les filaments d'actine avec les microtubules, a été localisée tout autour de la plaque cuticulaire et pourrait être également une de ces protéines *linkers* (Antonellis et al., 2014). Ces microtubules permettraient de lier la plaque cuticulaire au reste de la cellule et lui permettre ainsi une certaine stabilité. Au cours du développement, les microtubules sont impliqués dans la formation de la plaque cuticulaire (Sobkowicz et al., 1995; Szarama et al., 2012). Les microtubules semblent également avoir un rôle réparateur. En effet, après une liaison de la cellule ciliée, les microtubules pénètrent dans la plaque cuticulaire et participent à sa restructuration ainsi qu'à la reformation des racines des stéréocils (Sobkowicz et al., 1995).

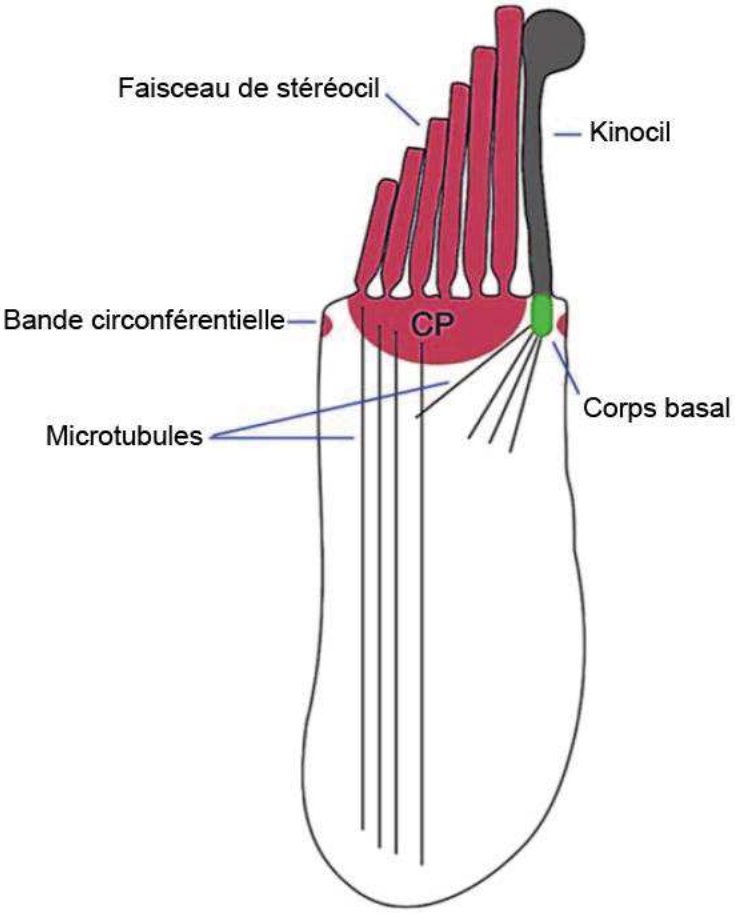


Figure 2.9 : Le cytosquelette du pôle apical des cellules ciliées. Les filaments d'actine (en rouge) sont fortement concentrés dans la plaque cuticulaire (CP), le faisceau de stéréocils et la bande circonférentielle. Durant le développement, le kinocil (en gris) participe au développement et à l'orientation du faisceau de stéréocil. Dans les cellules ciliées auditives, le kinocil disparaît durant le dernier stade du développement. Contrairement aux stéréocils, le kinocil est constitué de microtubule. Un certain nombre de microtubules émergent du corps basal (en vert) en direction du cytoplasme. A l'inverse, des colonnes de microtubules en provenance du cytoplasme pénètrent dans la plaque cuticulaire. Modifié d'après Pollock et McDermott, 2015.

Au-dessous de la plaque cuticulaire, se trouve l'organelle striée, une structure faite d'un mélange de faisceau fins et épais, aussi parfois appelée corps de Friedmann (Friedmann et al., 1963; Slepecky et al., 1980; Vranceanu et al., 2012). Les deux structures sont séparées par un contingent de larges mitochondries mais sont connectées entre elles via les extensions de l'organelle striée. En effet, certains faisceaux de l'organelle striée contactent les racines des stéréocils. Par ailleurs, d'autres faisceaux de l'organelle striée s'attachent à la membrane plasmique. La sous-unité α2 de la spectrine est le seul constituant connu de l'organelle striée (Dememes et Scarfone, 1992). Le rôle supposé de l'organelle striée serait de stabiliser la plaque cuticulaire.

D'un point de vue moléculaire, les filaments d'actine qui constituent la plaque cuticulaire sont composés des isoformes γ- et β-actine (Furness et al., 2005; Perrin et al., 2010). L'isoforme γ-actine est la plus présente alors que l'isoforme β-actine est plus concentrée dans les racines des stéréocils.

En plus de l'actine, plusieurs protéines participent à la structuration de la plaque cuticulaire : Plastine 1, ou Fimbrine, une protéine qui lie les filaments d'actine en faisceau, est localisée dans la plaque cuticulaire, ainsi que dans les stéréocils (Slepecky et Chamberlain, 1985). Si Plastine 1 est essentielle à la fasciculation des filaments d'actine dans les stéréocils, son rôle dans la plaque cuticulaire reste inconnu. Chez les souris mutantes pour *Pls1*, les cellules ciliées arborent des stéréocils anormalement fins, longs et courbés. En revanche, la taille ainsi que l'organisation des filaments d'actine de la plaque cuticulaire ne sont pas altérés (Taylor et al., 2015).

La Myosine VI est localisée dans la plaque cuticulaire et le cytoplasme des cellules ciliées (Hasson et al., 1997). Chez la grenouille, elle est également située dans le faisceau de stéréocils ; ce qui ne semble pas être le cas chez le rongeur. Chez les souris Snell's waltzer, mutantes pour le gène *Myo6*, des excroissances de la plaque cuticulaire apparaissent entre les stéréocils (Self et al., 1999). Par ailleurs, les stéréocils s'allongent et fusionnent. La Myosine VI permettrait d'attacher la surface apicale de la plaque cuticulaire à la membrane plasmique.

La myosine VIIa est localisée dans les stéréocils, la plaque cuticulaire ainsi que dans la région située autour de la plaque cuticulaire (Hasson et al., 1997). Des mutations dans le gène *MYO7A* sont responsables du syndrome Usher de type 1b et de surdités non-syndromiques (Weil et al., 1995). Chez les souris Shaker-1, mutantes pour *MYO7A*, il y a une désorganisation du faisceau de stéréocil et une déformation de la plaque cuticulaire (Self et al., 1998).

La Protocadherine 15, une composante des tip links, est localisée sur toute la longueur des stéréocils y compris dans les racines à l'intérieur de la plaque cuticulaire (Ahmed et al., 2003; Senften et al., 2006). Une mutation de *Pcdh15* chez la souris Ames waltzer entraîne des déficits auditifs et vestibulaires associés à une désorganisation des stéréocils, un défaut dans la polarité planaire et une déformation de la plaque cuticulaire (Pawlowski et al., 2006; Kikkawa et al., 2008). La Protocadherine 15 et la Myosine VIIa sont connues pour interagir ensemble (Senften et al., 2006) et les différentes mutations associées à ces deux protéines entraînent un mauvais positionnement des vésicules dans les cellules ciliées. Ainsi, ces deux protéines seraient impliquées dans le trafic vésiculaire au niveau de la plaque cuticulaire. Une mauvaise régulation de ce trafic serait responsable d'une déstructuration de la plaque cuticulaire et du faisceau de stéréocil.

La protéine ACF7, qui lie les filaments d'actine et les microtubules (Leung et al., 1999), est présente autour de la plaque cuticulaire, dans le corps basal et au niveau de la surface basale de la plaque cuticulaire (Antonellis et al., 2014). Ces donnés suggèrent que ACF7 permettrait de relier les filaments d'actine de la plaque cuticulaire aux microtubules environnants.

La protéine XIRP2, dont la fonction est de lier les filaments d'actine entre eux, est localisée dans les stéréocils, la plaque cuticulaire et la bande circonférentielle (Francis et al., 2015; Scheffer et al., 2015). Chez les souris mutantes pour *Xirp2*, les stéréocils dégénèrent et des expansions de la membrane plasmique apparaissent au niveau de la surface apicale des cellules ciliées (Scheffer et al., 2015). Ces expansions ne contiennent ni actine ni microtubules et semblent être causées par une déformation de la plaque cuticulaire ou une perte des connexions entre la plaque cuticulaire et la membrane plasmique.

Nom	Localisation	Rôle
β-actine	Stéréocils et racines des stéréocils	Constituant des filaments d'actine
γ-actine	Stéréocils, plaque cuticulaire	Constituant des filaments d'actine
FCHSD1	Plaque cuticulaire	Favorise l'activité de SNX9
α-actinine	Plaque cuticulaire (surface apicale et entre les stéréocils)	Elasticité de la plaque cuticulaire
ACF7	Plaque cuticulaire (surface apicale)	Liaison avec les microtubules
Myosine VI	Plaque cuticulaire	Liaison avec la membrane plasmique
Myosine VIIa	Stéréocils, plaque cuticulaire	Traffic vésiculaire
Plastine-1	Stéréocils et plaque cuticulaire	Fasciculation des filaments d'actine
Profiline	Plaque cuticulaire	Séquestration de l'actine
Protocadherine 15	Stéréocils	Trafic vésiculaire
SNX9	Plaque cuticulaire	Polymérisation des filaments d'actine
Spectrine	Plaque cuticulaire	Fasciculation des filaments d'actine Liaison avec la membrane plasmique Rigidité de la plaque cuticulaire
Tropomyosine	Stéréocils et racines des stéréocils	Stabilisation des filaments d'actine
XIRP2	Stéréocils, plaque cuticulaire	Liaison entre les filaments d'actine

Tableau 2.1 : Les protéines de la plaque cuticulaire

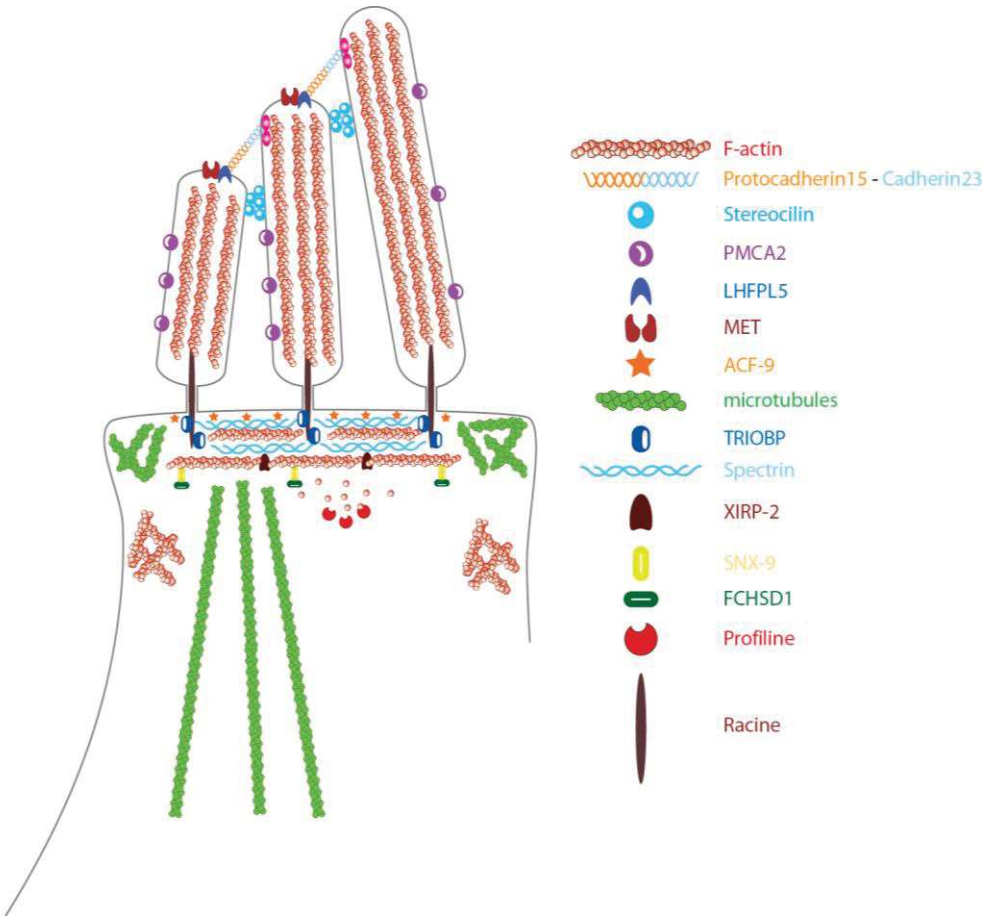


Figure 2.10 : Principaux constituants des stéreocils et de la plaque cuticulaire. Outre les filaments d'actine, les stéréocils et la plaque cuticulaire sont constitués de diverses protéines associées au cytosquelette. Une première population de microtubule forme un anneau autour de la plaque cuticulaire. Juste en-dessous, se trouvent les filaments d'actine qui constituent la bande circonférentielle. Une seconde population de microtubule en provenance du cytoplasme s'insère dans la plaque cuticulaire.

2.1.2. Physiologie de la cochlée

Lors d'une stimulation acoustique, les ondes sonores se propagent le long de la membrane basilaire et de la membrane tectoriale (Lee et al., 2015), depuis la base jusqu'à l'apex de la cochlée (axe tonotopique). Ce faisant, le mouvement des membranes basilaire et tectoriale provoque la déflection des stéréocils des cellules ciliées, et par conséquent l'ouverture du canal mécanotransducteur. L'entrée de cations, principalement de potassium, dépolarise alors les cellules ciliées. L'activation des CCE se traduit par l'amplification des mouvements des membranes basilaire et tectoriale et participe ainsi à la sélectivité en fréquence. A noter, que les CCE amplifient les ondes sonores grâce à leur propriétés électomotiles (Zheng et al., 2000; Liberman et al., 2002; Ashmore, 2008; Johnson et al., 2011) et/ou la déflection du faisceau de stéréocils (Kennedy et al., 2005).

L'activation des CCI provoque l'entrée de calcium, à travers des canaux calciques voltage-dépendants, qui induit la libération de glutamate, le neurotransmetteur des CCI, dans la fente synaptique. Le glutamate active ensuite les neurones afférents qui véhiculent les informations sonores jusqu'au noyau cochléaire, situé dans le tronc cérébral. Les messages nerveux reçus par le noyau cochléaire sont ensuite transmis, via de multiple relais, au cortex auditif qui analyse et interprète les informations sonores.

Ainsi, la détection et la transmission de l'information sonore, au niveau périphérique, se décomposent en plusieurs étapes : 1) transfert et propagation de l'onde sonore le long de la cochlée, 2) amplification des ondes sonores par les CCE, 3) libération du neurotransmetteur par les CCI et 4) activation des neurones afférents. Les neuropathies auditives forment une classe de surdités qui se caractérisent par des potentiels évoqués auditifs désynchronisés voire

absents et des otoémissions acoustiques (témoins de l'activité des CCE) normales. Les neuropathies auditives peuvent donc être le résultat d'une altération des synapses à rubans (synaptopathie), des fibres auditives (neuropathie), de la gaine de myéline recouvrant les fibres auditives (myélinopathie) ou des CCI (cellulopathie) (Moser et al., 2013). L'étiologie de la neuropathie auditive est complexe et comprend des facteurs aussi bien génétiques qu'environnementaux. Certaines neuropathies auditives sont associées à d'autres pathologies (neuropathies auditives syndromiques) alors que d'autres ne sont associées à aucun autre déficit (neuropathies auditives non-syndromiques).

2.2. Synaptopathies auditives

2.2.1. Organisation de la synapse à ruban

La synapse entre la CCI et le neurone afférent permet un codage temporel précis et soutenu sur de longues périodes de temps. Sur le plan anatomique et fonctionnel, elle diffère des synapses du système nerveux central.

L'élément présynaptique dans la CCI possède une structure particulière, dense aux électrons, appelée le ruban synaptique (Nouvian et al., 2006). Celui-ci est ancré à la membrane plasmique et est entouré d'une monocouche de vésicules synaptiques (environ une centaine par ruban). La protéine Ribeye est, à ce jour, le seul constituant connu du ruban synaptique (Schmitz et al., 2000; Zenisek et al., 2003). Il y a un ruban par synapse dans les CCI adultes et entre 6 à 20 synapses par CCI (Bourien et al., 2014; Kujawa et Liberman, 2009; Meyer et al., 2009). A noter que parmi le nombre total de rubans contenus dans une

cellule, 5% sont localisés dans le cytoplasme (rubans flottants cytoplasmiques) et reflètent probablement le recyclage des rubans à la membrane. Cependant, les rubans synaptiques sont relativement immobiles sur plusieurs minutes (entre 0.35 to 13.5 nm/sec; Zenisek et al., 2004). Chaque zone active est connectée par la terminaison d'une seule fibre afférente du nerf auditif. La forme des rubans varie en fonction des espèces et de l'âge. Par exemple, les rubans des cellules vestibulaires de la grenouille sont ronds (diamètre 400 nm environ) ; à l'inverse, ils ont une forme ovoïde dans les CCI adultes de souris (diamètre 300, 200 et 50 nm). Dans les CCI immatures, il y a plusieurs rubans par synapse.

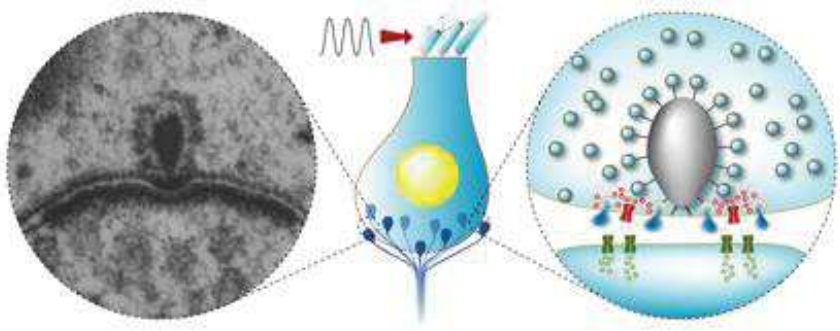


Figure 2.8 : Transduction des cellules ciliées internes. La dépolarisation de la cellule ciliée interne, en réponse à une onde sonore, ouvre les canaux calciques (rouge), situés à proximité des zones actives. Ces dernières se caractérisent par un ruban synaptique (gris), ancré à la membrane plasmique et entouré d'un halo de vésicules synaptique. L'élévation de calcium intracellulaire (points rouges) provoque l'exocytose des vésicules synaptiques et la libération du glutamate dans la fente synaptique. L'activation des récepteurs au glutamate (vert) est associée aux courants excitateurs post-synaptiques. Le message nerveux est véhiculé jusqu'au noyau cochléaire du tronc cérébral via les neurones auditifs primaires (bleu foncé).

Les CCI n'expriment pas les gènes codants pour les protéines SNARE neuronales, indispensables à la fusion vésiculaire dans les synapses du système nerveux (Nouvian et al., 2011). Ainsi, par exemple, les synaptotagmines I et II, utilisées comme détecteur calcique de la fusion vésiculaire dans la plupart des synapses du système nerveux ne sont pas exprimées dans les CCI. En revanche, la CCI exprime le gène *OTOF* qui code pour la protéine otoferline, essentielle à la fusion vésiculaire et/ou au réapprovisionnement des vésicules synaptiques aux sites de fusion (Yasunaga et al., 1999; Roux et al., 2006; Pangrsic et al., 2010). De même, le

remplissage des vésicules synaptiques, dans les neurones glutamatergiques, est assuré par les transporteurs VGlut1 ou VGlut2, alors que, dans les CCI, cette activité est assurée par le transporteur VGlut3 (Ruel et al., 2008; Seal et al., 2008). Enfin, l'entrée de calcium au niveau des zones actives est assurée par le canal $Ca_V1.3$, à l'inverse des canaux $Ca_V2.1$ et $Ca_V2.2$ généralement utilisée par les neurones, en raison de leur perméabilité au calcium plus importante (Platzer et al., 2000; Brandt et al., 2003). Une perturbation de l'activité synaptique dans les CCI résulte en une neuropathie auditive, qui peut être aussi appelée, dans ce cas-là, synaptopathie auditive.

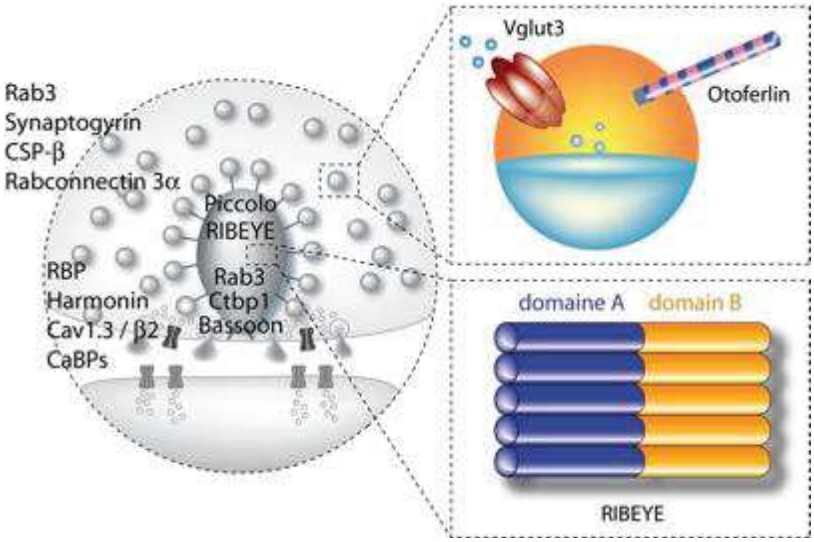


Figure 2.9 : Principaux constituants des synapses à ruban. Les rubans synaptiques contiennent RIBEYE, Ctbp1 (pour C-terminal binding protein 1), Piccolo et Rab 3 (Khimich et al., 2005). L'empilement de RIBEYE forme le ruban grâce aux multiples interactions RIBEYE-RIBEYE (Magupalli et al., 2008). Bassoon ancre les rubans à la membrane (Dick et al., 2003). Harmonine régule la distribution des canaux calciques (Gregory et al., 2011) formés par les sous-unités Cav1.3/β2 (Brandt et al., 2003), et dont l'inactivation est régulée par les membres de la famille CaBP (Cui et al., 2007). RBP (Rim Binding Protein) pourrait être responsable de l'association des canaux calciques avec les vésicules synaptiques (Hibino et al., 2002). Outre Vglut3 et otoferline, les CCI expriment d'autres protéines vésiculaires, à savoir Cystein-String Protein (CSP), Synaptogyrine, Rabconnectine et Rab3 (Eybalin et al., 2002).

2.2.2. La synaptopathie auditive DFNB9

Une mutation du gène *OTOF* conduit à la surdité non-syndromique DFNB9. Chez la plupart des patients, la surdité est sévère voire profonde et apparait dès les deux premières années de la vie (Chaib et al., 1996). Chez les autres patients, la surdité est dépendante de la température corporelle (Varga et al., 2006; Marlin et al., 2010). En effet, les patients en question ont une audition proche de la norme lorsque leurs températures corporelles est de 37°C mais manifestent une surdité profonde lors d'un effort physique ou lors d'un état fiévreux, par exemple.

L'otoferline appartient à la famille des ferlines, au même titre que la dysferline et la myoferline, connues pour réguler des processus de fusion membranaire. A l'instar des synaptotagmines, les ferlines sont constituées de plusieurs domaines C_2 qui fixent le calcium et se lient aux phospholipides. L'otoferline est localisée à proximité des vésicules synaptiques (Roux et al., 2006). A ce jour, 90 mutations du gène *OTOF* conduisant à la synaptopathie auditive DFNB9 ont été recensées (Yasunaga et al., 1999). La plupart d'entre elles sont des mutations non-sens ou des troncations. Les souris knock-out pour *OTOF* (*OTOF*-KO) présentent une surdité sévère (Roux et al., 2006; Pangrsic et al., 2010). Chez ces souris, les potentiels évoqués auditifs sont absents mais les otoémissions acoutiques sont conservées. Au niveau cellulaire, l'exocytose des CCI est abolit, malgré la présence de vésicule synaptique à proximité de la membrane plasmique.

L'otoferline, dans les CCI, pourrait assurer un rôle semblable à celui des synaptotagmines I et II, à savoir la détection du calcium pour entrainer la fusion vésiculaire. La localisation de l'otoferline autour des vésicules synaptiques, sa structure, ses propriétés biochimiques et les conséquences de sa perte de fonction sur l'exocytose soutiennent cette hypothèse. Toutefois, l'expression forcée de la synaptotagmine I dans la CCI ne parvient pas à

restaurer l'exocytose (Reisinger et al., 2011). Mais ceci pourrait s'expliquer par l'absence des partenaires de la synaptotagmine I dans la CCI.

Un autre modèle pour la surdité DFNB9 est la souris *Pachanga* chez laquelle le gène *OTOF* comporte une mutation faux-sens (Pangrsic et al., 2010). Chez ce modèle, la mutation conduit à une baisse du niveau de production d'otoferlin. Les CCI de la souris *Pachanga* sont capables de répondre à un stimulus sonore de courte durée. En revanche, l'exocytose est altérée lorsque la stimulation sonore perdure un certain temps. Ces résultats suggèrent un second rôle de l'otoferline dans le recyclage vésiculaire, à savoir favoriser le réapprovisionnement vésiculaire. Ainsi, l'otoferline, en interaction avec la protéine AP2, accélérerait la libération du glutamate afin de permettre une endocytose et un recyclage rapide des vésicules synaptiques (Duncker et al., 2013; Jung et al., 2015). Par ailleurs, plusieurs études suggèrent que la synaptotagmine I participerait elle aussi à l'endocytose des vésicules synaptiques (Poskanzer et al., 2003; Nicholson-Tomishima et Ryan, 2004).

Enfin, les filaments tethers qui assurent la liaison des vésicules à la membrane plasmique sont anormalement petits en absence d'otoferline. Ce résultat suggère que l'otoferline participerait à la maturation des vésicules (amorçage) afin de les rendre compétentes pour l'étape de fusion vésiculaire.

Bien que les fonctions exactes de l'otoferline restent encore à déterminer, les données actuelles mettent en évidence un ou plusieurs rôles (amorçage, fusion, répapprovissionnement), indispensable(s) de l'otoferline dans la communication synaptique. Alors que les mutations non-sens et les troncations abolissent totalement l'activité de l'otoferline et par là-même celle de la synapse, les mutations faux-sens peuvent conduire à un phénotype plus modéré avec une baisse du niveau d'expression du gène *OTOF*, une altération d'une ou plusieurs fonctions de l'Otoferline, ou une perturbation des interactions entre l'otoferline et ses partenaires.

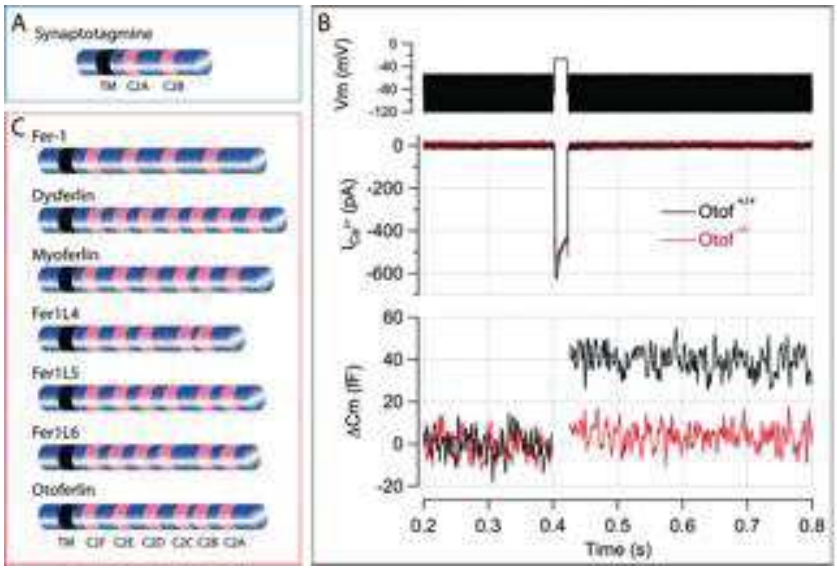


Figure 2.10 : Ferlines et exocytose. (**A**) Les synaptotagmines possèdent 2 domaines C_2 (C2A et C2B), qui fixent les phospholipides de manière dépendante au calcium et confèrent aux synaptotagmines leur rôle de détecteur calcique dans la fusion vésiculaire. (**B**) Les ferlines possèdent plusieurs domaines C_2. Fer-1 est essentielle à la fusion vésiculaire dans les spermatides de *C. elegans*. Dysferline est requis pour la réparation des fibres musculaires, qui nécessite la fusion de vésicules à la membrane de façon dépendante au calcium. Myoferline est impliquée dans la fusion des myoblastes, à l'origine des muscles squelettiques. En revanche, les rôles de Fer1L4, Fer1L5 et Fer1L6 restent indéterminés (Han et Campbell, 2007). (**C**) Mesure de l'exocytose des cellules ciliées internes en patch-clamp. L'ouverture des canaux calciques et l'influx de calcium (ICa^{2+}) évoqué par un saut de potentiel dépolarisant (Vm) se traduit en patch-clamp par un courant entrant calcique. Ce dernier provoque la fusion de vésicules synaptiques à la membrane plasmique, qui se traduit par un saut de capacité membranaire (Cm, indice de la surface plasmique). Chez les souris dont le gène *OTOF*, qui code otoferline, a été invalidé par recombinaison homologue (rouge), l'entrée de calcium n'évoque pas de saut de capacité membranaire, ce qui indique l'absence d'exocytose (Roux et al., 2006).

2.2.3. La synaptopathie auditive DFNA25

DFNA25 est une surdité non-syndromique. Elle se manifeste après l'acquisition du langage (surdité post-linguale) et progresse avec l'âge. Le déficit auditif touche uniquement les hautes fréquences. DFNA25 est causée par une mutation dominante dans le gène *SLC7a8* qui code pour le transporteur VGlut3 (Greene et al., 2001; Ruel et al., 2008). Ce dernier assure l'entrée du glutamate dans les vésicules synaptiques. Tandis que les souris dont le gène Slc17a8 a été invalidé présentent une surdité sévère, la surdité observée chez les patients DFNA25 est progressive. Ces résultats indiquent que les souris sans Vglut3 ne reproduisent pas la surdité DFNA25 et appellent à l'étude d'un modèle murin porteur de la mutation humaine A211V. Si la morphologie des synapses ainsi que l'entrée de calcium et le cycle vésiculaire au niveau du ruban synaptique sont normaux, les neurones afférents n'émettent aucun potentiel

d'action. Le mécanisme moléculaire par lequel la mutation de *SLC7a8* affecte la communication synaptique dans la surdité DFNA25 reste encore à déterminer. Il est fort probable qu'une baisse de production de VGlut3 fonctionnel soit à l'origine d'une concentration trop faible de glutamate dans les vésicules synaptiques. Le faible taux de neurotransmetteur dans la fente synaptique expliquerait alors l'absence d'activation des neurones afférents. Néanmoins, on ne peut pas exclure l'hypothèse d'une mutation gain-de-fonction qui entraînerait, au contraire, une concentration trop élevée de glutamate dans les vésicules synaptiques, conduisant ainsi à un phénomène d'exitotoxicité sur les neurones afférents.

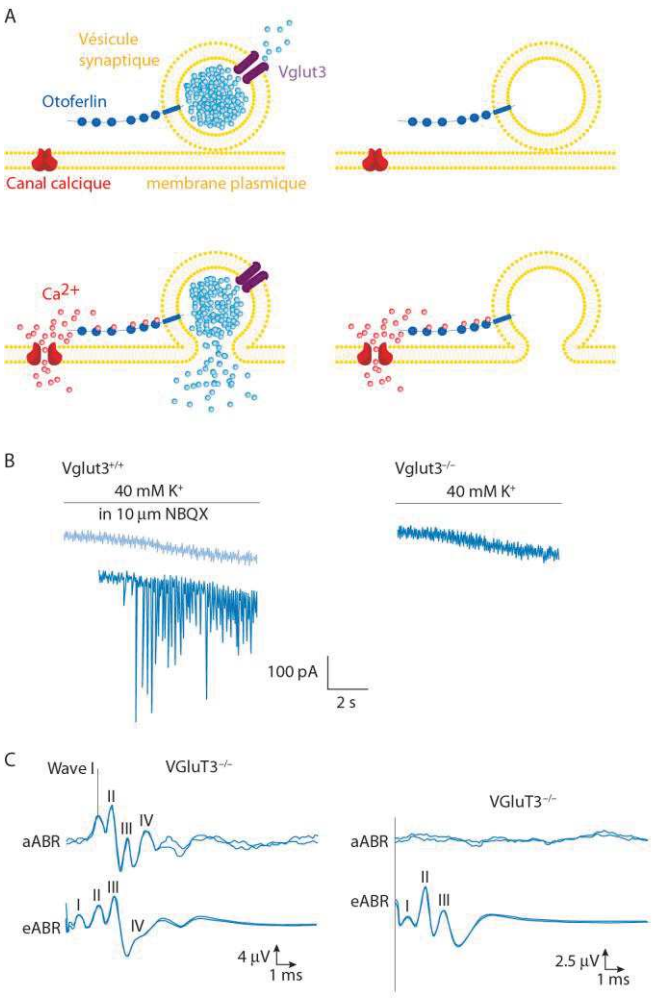


Figure 2.11 : Vglut3 est essentielle au transfert synaptique. (**A**) Schéma décrivant le rôle supposé de Vglut3 dans les cellules ciliées internes (CCI). Chez les souris sauvages, l'entrée de calcium (points rouges) provoque la fusion des vésicules à la membrane plasmique et la libération de glutamate (points bleus) dans la fente synaptique. Chez les souris Vglut3$^{-/-}$, les vésicules fusionnent toujours à la membrane plasmique mais le glutamate n'est pas libéré. (**B**) Enregistrement en patch-clamp des boutons terminaux des fibres afférentes de type I. L'application de KCl provoque la dépolarisation des CCI et par conséquent la libération de glutamate sur la fibre du nerf auditif. Cette exocytose se traduit par des courants post-synaptiques excitateurs qui sont bloqués par l'antagoniste NBQX. Chez les souris Vglut3$^{-/-}$, aucun courant post-synaptique excitateur n'est détecté, ce qui reflète l'absence de glutamate intravésiculaire (Seal et al., 2008). (**C**) Potentiels évoquées auditifs (PEA) en réponse à une stimulation sonore (haut, aABR) et électrique (bas, eABR). Tandis que l'absence des PEA chez la souris Vglut3$^{-/-}$ reflète l'absence de glutamate libéré, la réponse à une stimulation électrique montre que les fibres du nerf auditif sont toujours fonctionnelles (Ruel et al., 2008). Modifié d'après Moser et Starr, 2016.

2.2.4. La synaptopathie auditive SAAND

Le syndrome SAND (tachycardie ou bradychardie associée à une surdité) est du à une mutation perte-de-fonction du gène *CACNA1D*. Ce dernier code pour la sous-unité α1 qui forme le pore du canal $Ca_V1.3$. La mutation induit l'insertion d'une glycine additionnelle dans la séquence de la sous-unité α1, ce qui bloque la conduction des ions Ca^{2+} (Baig et al., 2011). La sous-unité α1 apparaît donc être importante pour l'activité synaptique des CCI. En accord avec cette conclusion, les souris KO pour le gène *CACNA1D* développent une surdité due à une perte de l'activité synaptique des CCI (Platzer et al., 2000).

A ce jour, aucune surdité liée à une mutation des autres sous-unités du canal $Ca_V1.3$ n'est été découverte. Néanmoins, une étude a démontré que la mutation de la sous-unité auxiliaire β2, chez la souris, conduit à une absence d'influx calcique au niveau du ruban synaptique et à une perte d'audition (Neef et al., 2009).

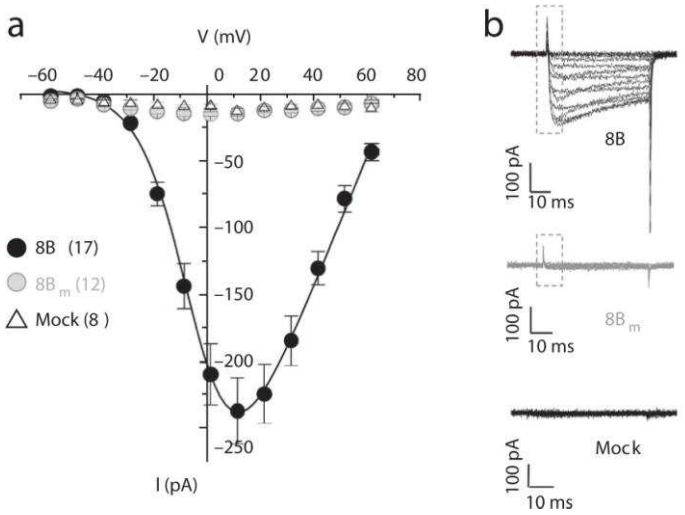


Figure 2.12 : Propriétés biophysiques du canal calcique $Ca_v1.3$ sauvages et muté dans le syndrome SAAND. (**a**) Courbe intensité-potentiel des courants calciques, induits par l'expression du canal $Ca_v1.3$ sauvage ou muté exprimé dans des cellules HEK. La forme mutée ne produit aucun courant détectable, à l'inverse de la forme sauvage. (**b**) Exemples de courants calciques sauvages (haut), muté (milieu) et contrôle (bas). Tandis que la forme sauvage entraine l'apparition d'un courant calcique entrant, la forme mutée se distingue seulement par des courants de type capacitif, ce qui reflète un changement de conformation du canal en réponse à une dépolarisation. La mutation n'altère dons pas l'adressage du canal à la membrane plasmique. En revanche, la mutation pourrait altérer l'ouverture du pore, ou bien empêcher le passage des ions calciques au travers du canal (Baig et al., 2011).

2.2.5. La synaptopathie auditive DFNB93

La surdité DFNB93 est associée à une mutation de la protéine CABP2 qui module l'activité du canal $Ca_V1.3$. Les rôles supposés des protéines CABP est d'abaisser le seuil d'activation des canaux calciques (Haeseleer et al., 2004) et de prévenir leur inactivation par par la calmoduline (Schrauwen et al., 2012). La mutation responsable de la surdité DFNB93 est à l'origine d'un épissage alternatif et par conséquent d'une troncation de CABP2. La protéine CABP2 tronquée ne possède plus de domaine de liaison avec les ions Ca^{2+} et est incapable d'entrer compétition avec la calmoduline.

2.2.6. La synaptopathie auditive due à l'exposition au bruit

L'exposition au bruit est une cause majeure de surdité, qui peut être associé à une perte de synapse entre les CCI et les neurones afférents (Puel et al., 1991; Henry et Mulroy, 1995; Puel et al., 1998; Stamataki et al., 2006; Sergeyenko et al., 2013). Lors d'une surexposition sonore (trauma acoustique), la libération massive de glutamate entraine le gonflement et l'éclatement des terminaisons des fibres afférentes. Malgré la réparation fonctionnelle de ces dernières (Puel et al., 1995), les rubans synaptiques disparaissent progressivement, sans doute en raison de l'influx massif de calcium présynaptiquement lors du trauma acoustique. Ce faisant, l'exposition au bruit pourrait être un facteur déterminant dans les neuropathies auditives acquises.

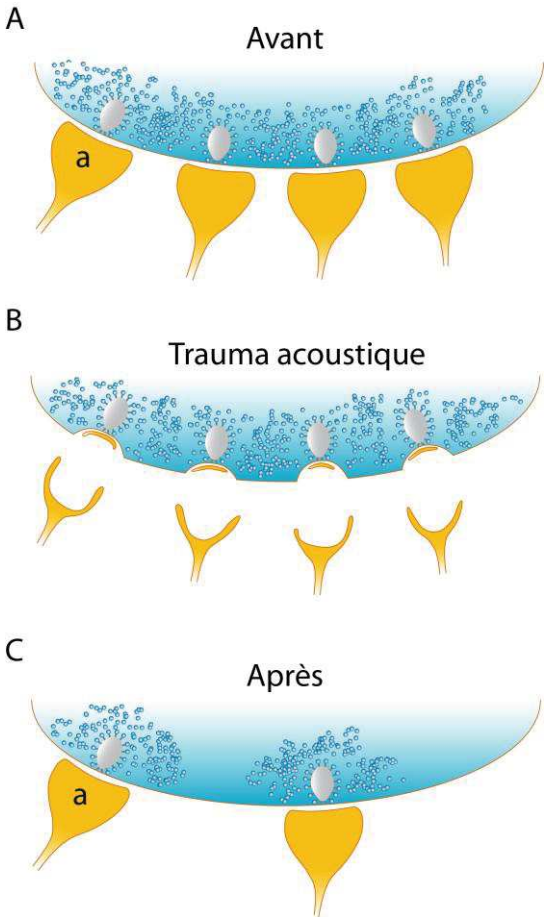


Figure 2.13 : Diminution du nombre de synapse suite à un trauma acoustique. (**A**) les fibres afférentes (a) contactent la cellule ciliée interne au niveau des rubans synaptiques. (**B**) Suite à un trauma acoustique, les terminaisons des fibres afférentes gonflent puis éclatent, en raison d'une libération massive de glutamate. (**C**) Après le trauma acoustique, un certain nombre de rubans synaptiques dégénèrent, probablement à cause d'une entré massive d'ions Ca^{2+} durant le trauma acoustique. Ainsi, le nombre de synapse par cellule ciliée interne se retrouve diminué.

2.3. Neuropathies auditives

2.3.1. Les neuropathies auditives associées aux mutations du gène *OPA1*

La perte d'audition est fréquente chez le syndrome de l'atrophie optique dominante causé par une mutation du gène *optic atrophy 1* (*OPA1*) (Yu-Wai-Man et al., 2010; Santarelli et al., 2015). La protéine OPA1 est une GTPase mitochondriale qui régule la structure de la

mitochondrie (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000). La majorité des 200 mutations connues du gène *OPA1* résulte en une troncation de la protéine et cause des atrophies optiques non-syndromique (Ferre et al., 2009). Les mutations non-sens, quant à elles, induisent probablement un effet dominant négatif, et sont responsables, dans 60% des cas, du syndrome de l'atrophie optique dominante qui associe cécité, surdité, neuropathie sensori-motrice, myopathie et ataxie (Yu-Wai-Man et al., 2010). Les analyses électrophysiologiques, réalisées chez les patients atteints de ce syndrome, révèlent un fonctionnement normal des CCE et des CCI mais une diminution de l'activité des neurones afférents (Santarelli et al., 2015). Les résultats favorisent l'hypothèse d'une dégénérescence des fibres auditives. Les souris $OPA1^{DelTTAG}$, portant la mutation du gène *OPA1* la plus fréquemment rencontrée chez l'homme, développent un syndrome d'atrophie optique dominante associant cécité, surdité progressive, encéphalomyopathie, ataxie, neuropathie périphérique et cardiomyopathie (Sarzi et al., 2012). Chez les souris $OPA1^{DelTTAG}$, les fibres des nerfs optique et sciatique meurent par autophagie. Bien que les fibres auditives n'aient pas été observées, il est fort probable que ce processus se produise également dans le nerf auditif des souris $OPA1^{DelTTAG}$. Ainsi, les analyses cliniques et les études réalisées sur modèle animal suggèrent une dégénérescence des fibres auditives chez le syndrome de l'atrophie optique dominante.

2.3.2. La neuropathie auditive AUNX1

La neuropathie auditive AUNX1 est caractérisée par une perte d'audition progressive, touchant surtout les basses fréquences (Wang et al., 2003; Wang et al., 2006). Le déficit auditif apparaît durant l'adolescence et s'accompagne, plusieurs mois ou années plus tard, de neuropathies sensitives. Les IRM des patients révèlent une hypoplasie du nerf auditif.

AUNX1 est causée par une mutation du gène *Apoptosis-inducing Factor 1* (*AIFM1*), situé sur le chromosome X (Zong et al., 2015). AIFM1 est une flavoprotéine localisée dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Elle est à la fois un facteur d'apoptose et une enzyme de type oxydoréductase (Hangen et al., 2010; Norberg et al., 2010; Polster, 2013). En présence de stimuli apoptotiques, AIFM1 se délocalise dans le noyau et induit un programme d'apoptose indépendant des caspases. Par ailleurs, grâce à son activité oxydoréductase et à ses interactions avec d'autres protéines mitochondriales, elle participe à l'activité de la chaîne respiratoire et régule la morphologie de la mitochondrie. Les diverses mutations responsables de la neuropathie AUNX1 affectent l'activité oxydoréductase d'AIFM1. Des examens histologiques réalisés chez la souris montrent une expression d'*AIFM1* dans les deux populations de cellules ciliées ainsi que dans les neurones afférents. Les mécanismes moléculaires impliqués dans AUNX1 n'ont pas encore été étudiés. L'hypoplasie du nerf auditif observée chez les patients suggère une atteinte des fibres auditives.

2.4. Myélinopathies auditives

2.4.1. Les myélinopathies auditives associées aux neuropathies sensori-motrices

Plusieurs neuropathies sensorimotrices de cause génétique sont accompagnées de neuropathie auditive. La maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1a, par exemple, est causée par une duplication du gène *PMP22* et est à l'origine d'une neuropathie auditive (Kovach et al., 2002; Verhagen et al., 2005; Rance et Starr, 2015). Un autre exemple est celui de la neuropathie causée par une mutation du gène *MPZ* exprimé dans les cellules de Schwann et

codant pour la protéine Myelin Point Zero (Starr et al., 2003; Kabzinska et al., 2007). Des examens réalisés sur le nerf auditif d'un patient révèlent une démyélinisation et une perte des fibres auditives.

2.5. Cellulopathies auditives

2.5.1. La cellulopathie auditive chez le bébé prématuré

La neuropathie auditive est particulièrement répandue chez les bébés prématurés (Kirkim et al., 2008). En effet, la probabilité pour un bébé prématuré de développer une neuropathie auditive est de 1 sur 50 alors que pour un bébé né à terme, elle est de 1 sur 1000 (Schulman-Galambos and Galambos, 1979). Le soin intensif et l'hyperbilirubinémie font partie des facteurs de risques. Les examens post-mortem révèlent chez les bébés prématurés atteints de neuropathie auditive un nombre normal de neurones afférents et une perte sélective des cellules ciliées internes (Amatuzzi et al., 2001). L'action de la bilirubine sur la cochlée est encore inconnue. Les principales hypothèses portent sur un effet toxique de l'oxyde nitrique sur l'élément présynaptique (Haustein et al., 2010) et une modification de l'homéostasie calcique (Spencer et al., 2002).

2.5.2. La cellulopathie auditive due à une carence en thiamine

Une carence en thiamine (vitamine B1) est responsable de neuropathie auditive chez l'enfant (Attias et al., 2012). Les effets de la thiamine sur le système auditif ont été étudiés à

partir d'un modèle murin knock-out pour le gène *Slc19a2* qui code pour un transporteur de la thiamine. Une de ces études démontre une perte rapide et massive des CCI induit par une alimentation pauvre en thiamine (Liberman et al., 2006). Cependant, la perte auditive est observée avant la dégénérescence des CCI (Oishi et al., 2002). De plus, chez les enfants ayant une carence en thiamine, la surdité est de nature transitoire et ne peut donc pas être due à une perte de CCI. Il semblerait donc que la carence de thiamine affecte d'abord l'activité des CCI avant d'induire leur perte. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre les effets exacts de la carence en thiamine sur les CCI.

2.5.3. La cellulopathie auditive AUNA1

AUNA1 est une neuropathie auditive génétique décrite pour la première fois chez une famille nord-américaine (Starr et al., 2004). Plusieurs membres de cette famille développent, en effet, une surdité associée à une activité normale des CCE. La transmission est dominante. La surdité semble apparaître au cours de l'adolescence et progresse sur 20 ans jusqu'à la perte totale de l'audition. Chez les sujets les plus âgés, la surdité est accompagnée d'une perte d'activité des CCE, reflétant probablement un effet du vieillissement. La neuropathie auditive AUNA1 est causée par une mutation dans le locus du gène *Diaphanous homolog 3* (*DIAPH3*) (Schoen et al., 2010). Cette mutation est située, plus précisément, dans la région 5' non codante de *DIAPH3*. Elle correspond à une substitution de nucléotide dans l'élément « GC Box », un site de fixation pour les facteurs de transcription. La mutation induit une surexpression de *DIAPH3*. La quantification d'ARNm révèle, en effet, un niveau d'expression de *DIAPH3* multiplié par 2 ou 3 dans les lymphoblastes des sujets atteints. La protéine DIAPH3 appartient à la famille des formines, des protéines ubiquitaires contrôlées par les

Rho-GTPases et impliquées dans la régulation du cytosquelette (Bartolini et Gundersen, 2010; Kuhn et Geyer, 2014). DIAPH3 favorise la nucléation et l'élongation des filaments d'actine et stabilise les microtubules.

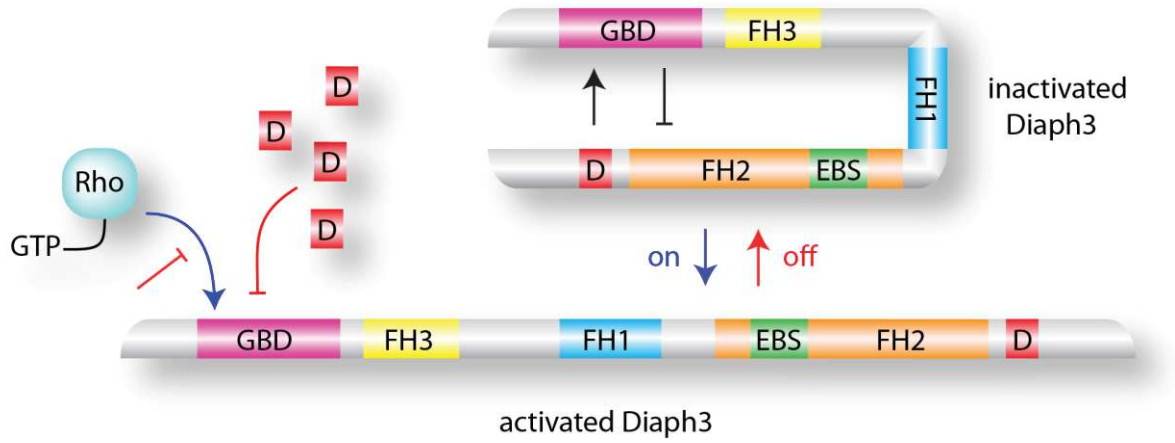


Figure 2.14 : Structure de la protéine DIAPH3. DIAPH3 est constitutivement inactive du fait de l'intéraction entre ses deux domaines auto-inhibiteurs GPTase Binding Domain (GBD) et Diaphanous autoregulatory domain (D). La liaison d'une RhoGTPase au domaine GBD induit l'activation de DIAPH3. DIAPH3 se lie aux filaments d'actine et aux microtubules via son domaine FH2. Le domaine FH1 se lie à la profiline, une protéine qui séquestre les monomères d'actine.

Pour étudier la neuropathie auditive AUNA1, l'équipe du Dr Lesperance a généré un modèle murin transgénique surexprimant *Diap3*, l'orthologue murin de *DIAPH3* (Schoen et al., 2013). Le transgène est composé d'un élément enhancer CMV (CytoMégaloVirus), d'un promoteur du gène *β-actine* de poulet et de la séquence codante du gène *Diap3*, le gène murin orthologue de *DIAPH3*. La combinaison de l'élément enhancer CMV et du promoteur *β-actine* de poulet permet une expression ubiquitaire et soutenue du gène *Diap3*. De cette manière, les souris transgéniques (Diap3-Tg) surexpriment *Diap3*. Parmi les différentes lignées Diap3-Tg ainsi obtenues, deux lignées développent une perte d'audition : la lignée FVB-Tg(CAG-Diap3)924Lesp/J et la lignée FVB-Tg(CAG-Diap3)771Lesp. Elles seront ici renommées respectivement lignées Tg 924 et Tg 771. Le nombre de copies du transgène diffère entre les

deux lignées : la lignée Tg 924 comporte six copies du transgène alors que celui de la lignée Tg 771 en comporte huit. Schoen et al. ont montré dans ces deux lignées une surdité progressive associée à une activité normale des CCE, confirmant ainsi que le modèle murin reproduit la neuropathie auditive humaine AUNA1. Le nombre de synapses par CCI diminue progressivement. Cependant, cette perte synaptique se produit après l'apparition de la surdité et ne peut donc pas être considérée comme la cause de celle-ci. En revanche, l'observation des CCI en microscopie électronique révèle un gonflement du pôle apical et une fusion des stéréocils visibles dès les premières pertes d'audition. Le faisceau de stéréocils des CCI est le siège de la mécanotransduction, processus qui transforme les ondes sonores en signaux électriques. Il est ainsi fort probable que les déformations observées au pôle apical des CCI soient à l'origine d'une perte de la mécanotransduction et par conséquent de la neuropathie auditive AUNA1.

3. Matériel et méthodes

3.1. Animaux

Les deux lignées murines Tg 924 et Tg 771 nous ont été gracieusement données par Marci Lesperance (University of Michigan Health System, Ann Arbor, MI, Etats-Unis). Les souris FVB/NJ sauvages ont été fournies par Janvier Labs. Les animaux ont été recueillis au sein de l'animalerie de l'Institut des Neurosciences de Montpellier. Leur hébergement et leur utilisation ont respectés le guide de bonne pratique de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). Le protocole d'expérimentation a été approuvé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et il a été enregistré auprès du Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimenation Animale sous le numéro 36 et auprès du Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale Languedoc-Roussillon sous la référence CEEA-LR-12111.

3.2. Tampons et solutions

Génotypage	
Tampon de lyse	100 mM Tris-HCl ; pH 7,6 200 mM NaCl 5 mM EDTA 0,2% SDS
Immunomarquage	
Tampon de lavage	PBS 1X 0,1% triton X-100
Tampon de blocage	PBS 1X 10% Sérum d'âne 0,3% triton X-100
Solution d'incubation	PBS 1X 1% Sérum d'âne 0,1% triton X-100
Extraction protéique et Western Blot	
Tampon de lyse pH 7,6	20 mM Tris-HCl ; 100 mM NaCl 5 mM EDTA 1% Triton X-100 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1X cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)
Tampon de lavage	Tris-buffered saline (TBS) 1X 0,1% Tween-20
Tampon de blocage	TBS 1X 0,1% Tween-20 3% Lait

3.3. Anticorps

Nom (fournisseur)	Dilution (Immunomarquages)	Dilution (Western Blot)
CtBP2 (BD Transduction Laboratories)	1/1000	
GluA2/3 (Millipore)	1:50	
Spectrine (Millipore)	1:400	
β1-tubuline (Novus Biologicals)	1:10	
β2-tubuline (Novus Biologicals)	1:500	
β4-tubuline (Abcam)	1:200	
α-tubuline-acétylée (Abcam)	1:500	
α-tubuline-détyrosinée (Abcam)	1:500	
α1-tubuline (Novus Biologicals)	1/500	1/5 000
Amphiphysine (Novus Biological)	1/200	
GFP (Abcam)		1/10 000
Diap3 (Eurogentec) (*)	1/200	1 /20 000

(*) L'anticorps anti-Diap3 est dirigé contre un motif spécifique de la protéine Diap3 murine (acide aminés 94-105 ; LSSETMENNPKA)

3.4. Génotypage

L'ADN a été extrait à partir de biopsie (doigt ou de bout de queue) prélevés sur les souris. Chaque échantillon a été digéré sur la nuit à 55°C dans 300µL de tampon de lyse contenant 100 µg/mL de protéinase K (Promega). Ils ont ensuite été centrifugés à 13 000 rpm pendant 5 min. Le surnageant a été récupéré et l'ADN a été précipité par ajout de 500µL d'isopropanol. Les échantillons ont à nouveau été centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 min. Le surnageant a été jeté et l'ADN lavé avec 500 µL d'éthanol 70%. Les échantillons ont été vortexés et centrifugés à 13 000 rpm pendant 5 min. Après évaporation de l'éthanol, le culot a été resuspendu dans 100 µL d'eau distillée.

La réaction de PCR a été préparée à partir de la solution « FastStart PCR Master Mix » (Roche), 0,2 µM d'amorce "Diap3-geno-Fwd" (5'-TGG TTA TTG TGC TGT CTC ATC A-3') et 0,2 µM d'amorce "Diap3-geno-Rev" (5'-TTG TCC AGC ATA TCA TCT GTC A- 3'). 1 µL d'échantillon à tester a été ajouté à 9µL du mélange et le tout a été incubé dans un

thermocycleur. Le programme de PCR utilisé était le suivant : 1) 10 min à 95°C ; 2) 40 cycles de 45 sec à 95°C, 40 sec à 62°C et 1 min à 72°C ; 3) 7 min à 72°C. Les échantillons ont ensuite été déposés sur un gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium. Après migration, les fragments amplifiés d'ADN ont été révélé par exposition aux UV. Le morceau de transgène amplifié par le couple d'amorce était reconnaissable par sa taille de 300 paires de bases (bp).

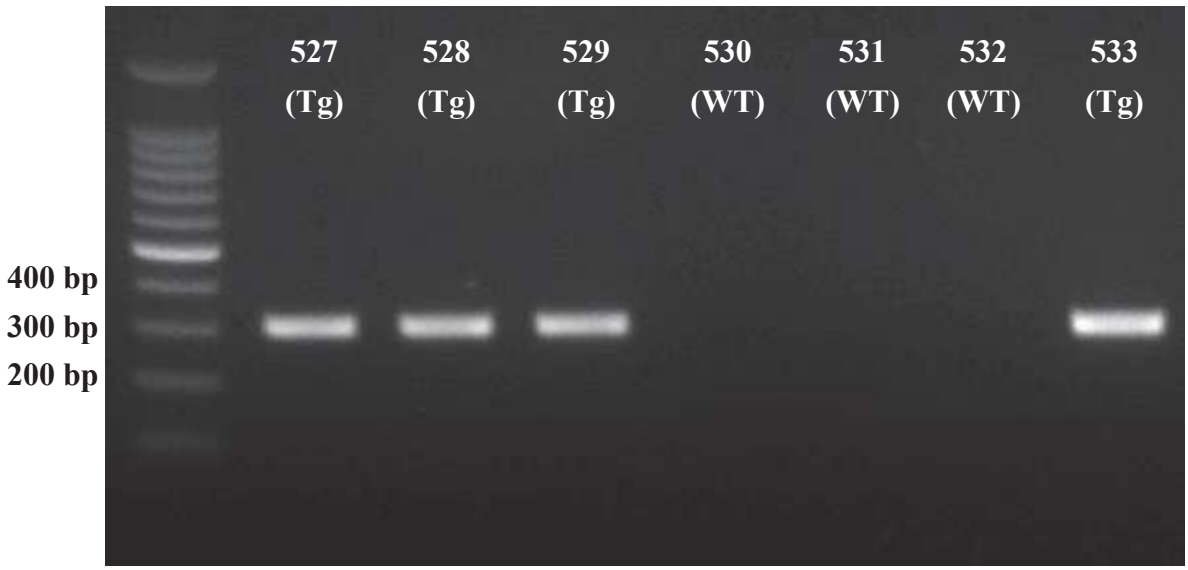


Figure 3.1 : Exemple d'un résultat de génotypage. Ici, les souris numéros n°527 à 533 ont été génotypées. Les fragments d'ADN de 300 pb visibles sur le gel est le résultat de l'amplification d'une partie du transgène par la réaction de PCR. Les souris n°527, 528, 529 et 533 sont donc transgéniques (Tg) et les souris n°530, 531 et 532 sauvages (WT).

3.5. Enregistrements in-vivo

Les souris ont été anesthésiées par une injection intra-péritonéale d'un mélange de Zolétil 50 (40 mg/Kg) et de Rompun 2% (3 mg/Kg), puis placées dans une chambre insonorisée, anéchoïque et faradisée. Leur température corporelle a été maintenue à 37°C grâce à une couverture chauffante régulée par une sonde rectale (Homeothermic Blanket Systems – Harvard Apparatus).

3.5.1. Enregistrements des Potentiels évoqués auditifs (PEA)

L'audition des souris a été analysée à partir de l'enregistrement des PEA qui reflètent l'activité de la voie auditive ascendante en réponse à un stimulus sonore. Les PEA sont caractérisés par plusieurs ondes dont chacune reflète l'activité d'un relai ou d'un noyau le long de la voie auditive ascendante : l'onde I reflète l'activité du nerf auditif, l'onde II celle du noyau cochléaire, l'onde III celle du noyau olive supérieur, l'onde IV celle du lemniscus latéral et l'onde V celle du noyau colliculus inférieur.

Deux électrodes ont été posées en sous-cutané sur les souris anesthésiées : l'une sur le vertex et l'autre sur la mastoïde gauche. Un haut-parleur (JBL 2426H) a été placé à 10,5 cm de l'oreille gauche. La différence de potentiel détectée entre les deux électrodes, en présence d'un stimulus sonore émis par le haut-parleur, correspond aux PEA. Ceux-ci ont d'abord été amplifiés 2500 fois (par un amplificateur P511 AC – Grass Technologies), puis échantillonnés (avec une fréquence de 50 kHz), enregistrés sur ordinateur (Dell T7 400) grâce à une carte d'acquisition NI PXI-1033 (National Instruments), filtrés avec un filtre bande-passante de 0,3 à 3 kHz et enfin moyennés (entre 150 et 1000 moyennages). La génération des stimuli et l'acquisition des données ont été réalisées grâce aux logiciels MATLAB (MathWorks) et LabView (National Instruments).

3.5.2. Enregistrements des produits de distorsion acoustiques

L'amplification des ondes sonores par les CCE est imparfaite et résulte en une dénaturation du stimulus sonore. Ce son dénaturé est composé de fréquences sonores additionnelles appelées produits de distorsions. L'étude de ces produits de distorsion permet

donc d'analyser l'activité des CCE. Pour cela, on émet un stimulus sonore composé de deux fréquences f1 et f2 suffisamment proches, et on étudie le produit de distorsion le plus ample généré par les CCE qui est la fréquence 2f1-f2 (Puel et al., 1995).

Une sonde ER-10C S/N 2528 (Etymotic Research), constituée de 2 émetteurs et d'un microphone, a été insérée dans le conduit auditif des souris anesthésiées. Les deux sons purs de fréquence f1 et f2 et d'une intensité de 65 dB SPL étaient délivrés par les émetteurs et la fréquence 2f1-f2 était enregistrée simultanément par le microphone. Les données ont été traitées avec le logiciel HearID auditory diagnostic system (Mimosa Acoustic). Le bruit de fond de la chambre insonorisée a également été enregistré. Toutes les ondes sonores d'une intensité inférieure à celle du bruit de fond n'ont pas été prises en compte dans l'analyse.

3.5.3. Electrococléographie

L'électrocochléographie est une méthode qui permet d'enregistrer le potentiel d'action composite (PAC) qui reflète la décharge synchrone des neurones afférents, le potentiel de sommation (PS) qui reflète l'activité des CCI et le potentiel microphonique (PM) qui reflète l'activité des CCE, en réponse à un stimulus sonore.

Une électrode d'argent a été posée sur la fenêtre ronde de la cochlée gauche des souris anesthésiées. Un haut-parleur (JBL 2426H) a été placé à proximité de l'oreille gauche. Le potentiel détecté par l'électrode, en présence d'un stimulus sonore émis par le haut-parleur, est le potentiel cochléaire global. Celui-ci a été traité de la même manière que les PEA mais filtrés cette fois-ci avec un filtre bande-passante de 0,001 à 20 kHz. Grâce au logiciel MATLAB, le potentiel cochléaire global a été filtré avec un filtre passe-bas de 3,5 kHz afin d'isoler le PAC le PS, ou un filtre passe-bande de 4 kHz afin d'isoler le PM.

3.6. Patch-clamp et patch perforé

L'enregistrement des courants potassiques, du potentiel de membrane et des courants calciques a été réalisé par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière. L'enregistrement de la capacité membranaire a été réalisé par la technique de patch perforé.

Les pipettes de verre utilisées ont été obtenues par l'étirement de capillaires de verre en borosilicate (Kwik Fil, WPI) à l'aide d'une étireuse verticale PIP6 (HEKA). Les pipettes utilisées pour les enregistrements de courant ionique ont été préalablement recouvertes à leurs extrémités d'un polymère hydrophobe non conducteur (Sylgard).

Après dislocation cervicale des souris, les cochlées ont été prélevées et disséquées dans la solution de dissection. Les organes de Corti ont été isolés et placés dans une chambre contenant une solution extracellulaire de composition variable selon l'expérience, sous un microscope droit Zeiss. Les CCE et les cellules de soutien ont été aspirées à l'aide d'une pipette de verre. Enfin, la pipette utilisée pour l'enregistrement, contenant une solution interne, de composition également variable selon l'expérience, a été apposée sur la CCI.

3.6.1. Enregistrement des courants potassiques et du potentiel de membrane

La solution extracellulaire utilisée contenait : 5,8 mM KCl, 144 mM NaCl, 0,9 mM $MgCl_2$-$6H_2O$, 1,3 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES et 10 mM D_Glucose. La solution interne contenait : 135 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$-$6H_2O$, 10 mM HEPES, 2 mM Mg-ATP et 0,3 mM Na-GTP. Les courants enregistrés ont été échantillonnés avec une fréquence de 50 kHz et filtrés avec un filtre passe-bas de 5 kHz.

3.6.2 Enregistrement des courants calciques et de la capacité membranaire

Pour l'enregistrement des courants calciques et de la capacité membranaire, les canaux potassiques ont été bloqués avec du Césium (Cs-glutamate), du tétraethylammonium (TEA) et de la 4-amino-pyridine (4-AP). La solution extracellulaire contenait : 2,8 mM KCl, 105 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$-$6H_2O$, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 35 mM TEA-Cl, 1 mM Cs-Cl et 10 mM D_Glucose. La solution interne utilisée pour l'enregistrement des courant calcique contenait : 135 mM Cs-glutamate, 10 mM TEA-Cl, 10 mM 4-AP, 1 mM $MgCl_2$-$6H_2O$, 10 mM HEPES, 2 mM Mg-ATP et 0,3 mM Na-GTP. Les courants enregistrés ont été filtrés avec un filtre passe-bas de 2 kHz et échantillonnés avec une fréquence de 40 kHz.

La solution interne utilisée pour l'enregistrement de la capacité membranaire contenait : 135 Mm Cs-glutamate, 10 mM TEA-Cl, 10 mM 4-AP, 1 mM $MgCl_2$-$6H_2O$ et 10 mM HEPES. Pour perforer la membrane, 400 µg/mL d'amphotéricine B fur ajouté à la solution interne. Les courants enregistrés ont été filtrés avec un filtre passe-bas de 2 kHz et échantillonnés avec une fréquence de 10 kHz.

3.7. Microscopie électronique

3.7.1 Préparation des cochlées

Après dislocation cervicale des souris, les cochlées ont été prélevées et rincées brièvement dans un tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,4). Elles ont ensuite été fixées par une injection intracochléaire de glutaraldéhyde 2,5% diluée dans le tampon phosphate puis par une incubation d'une heure à température ambiante dans le même fixateur. Elles ont ensuite été rincées à nouveau dans le tampon phosphate.

3.7.2 Microscopie électronique à balayage

Les cochlées ont été disséquées dans le tampon phosphate. Afin de permettre l'observation de la surface de l'organe de Corti, une large ouverture a été réalisée dans la paroi osseuse, la strie vasculaire ainsi que les membranes de Reissner et tectoriale ont été retirées. Les cochlées ont ensuite été déshydratées par une série de bains dans une solution d'alcool de concentration croissante (de 30% à 100%). Une déshydratation finale a été réalisée dans du CO_2 portée à son point critique (31°C ; 74 bars). Une fine couche d'or-palladium de 40 nm a été déposée sur les cochlées afin de les rendre conductrice. Les cochlées ont ensuite été scellées sur un plot métallique avec de la colle argentique et observées avec un microscope électronique à balayage Hitachi S4000.

3.7.2 Microscopie électronique à transmission

Les cochlées ont été post-fixées par perfusion intracochléaire d'une solution d'acide osmique 2% diluée dans le tampon phosphate puis par incubation d'une heure dans cette même solution. Elles ont ensuite été rincées dans le tampon phosphate, déshydratées dans une solution d'alcool de concentration croissante (de 30% à 100%), enrobées dans une résine (EMBed 812) et chauffées à 60°C pendant 36h pour permettre la polymérisation de la résine. Les blocs de résine ont ensuite été scindés en deux avec une mini-scie circulaire suivant un axe verticale passant par le modiolus. Les demi-tours de cochlées obtenues ont été isolées et des portions de l'organe de Corti, sélectionnées à différents niveaux entre la base et l'apex, ont été collés sur un support de résine suivant la technique de (Spoendlin et Brun, 1974). Des coupes semi-fines (1 µm) et ultrafines (10 nm) ont été réalisées avec un ultramicrotome (Leica-Reichert Ultracut S). L'orientation de l'organe de Corti a été déterminée sur les coupes semi-fines colorées au bleu de toluidine observées en microscopie photonique. Les coupes ultrafines, contrastées avec de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb, ont été observées avec un microscope électronique à transmission Hitachi 7100.

3.8. Immunomarquages

Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale. Les cochlées ont été prélevées et placées dans une solution de PBS. Des trous ont été percés à l'apex ainsi qu'au niveau des fenêtres rondes et ovales pour permettre la diffusion du fixateur. Les cochlées ont été fixées par une solution de PFA 4% diluée dans du PBS durant 30 minutes puis rincées avec 3 bains successifs de 10 minutes dans la solution de lavage. Les cochlées ont été ensuite disséquées

dans la solution de lavage. Les tours apicaux des organes de Corti ont été extraits et incubés dans la solution de blocage. Durant l'étape de blocage, les tissus ont été recouverts de protéines qui ont retenu les fixations aspécifiques du/des anticorps primaire(s). Les organes de Corti ont ensuite été incubés sur la nuit à 4°C dans la solution d'incubation contenant le ou les anticorps primaire(s). Les tissus ont été rincés 5x5 min dans le tampon de lavage. Cette étape a permis d'éliminer les protéines ajoutées qui retenaient les fixations aspécifiques de l'anticorps. Ils ont ensuite été incubés 2 heures dans la solution d'incubation contenant le/les anticorps secondaire(s) couplés avec des fluorophores, la phalloïdine et/ou le colorant Hoechst. Ils ont été à nouveaux rincés 5x5 min puis montés entre lame et lamelle dans une solution de montage (Prolong Gold Antifade Reagent - Fisher scientific). Les échantillons ont été observés avec le microscope confocal Zeiss LSM780 ou Leica SP8-UV de la plateforme Montpellier RIO Imaging. Les séries d'images ont été analysées avec les logiciels ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) et, pour le comptage des synapses, MATLAB.

3.9. Test de la spécificité de l'anticorps anti-Diap3

La spécificité de l'anticorps anti-Diap3 a été testée en western blot sur des extraits protéiques de cellules rénales embryonnaires humaines 293 (HEK) surexprimant les protéines Diap1, Diap2 ou Diap3 fusionnées avec la GFP.

3.9.1. Culture des cellules HEK

La lignée de cellules HEK a été maintenu dans un milieu de culture DMEM/F12 (life technologies, Carlsbad, CA, USA) supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin (Gibco,

Carlsbad, CA, USA) et 1% de mélange Pénicilline/Streptomycine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), dans un incubateur à CO_2 (5% CO_2 ; 37°C).

3.9.2. Plasmides

Les plasmides utilisés pour induire la surexpression des protéines Diap-GFP dans les cellules HEK étaient : pReceiver-M03-Diap1 (Genecopoeia, Rockville, MD, USA), pEGFP-C3-Diap2 et pEFmEGFP-Diap3 (Addgene, Cambridge, MA, USA). Pour construire le plasmide pEGFP-C3-Diap2, la séquence codante du gène *Diap2* a été sous-clonée à partir du plasmide donneur pCMV6-Ac-GFP-Diap2 (Origene, Rockville, MD, USA) dans le plasmide receveur pEGFP-C3 (Takara, Kyoto, Japan) grâce à l'utilisation du kit In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara, Kyoto, Japan). Pour cela, la séquence codante du gène *Diap2* a été amplifiée à partir du plasmide donneur avec les oligonucléotides suivants : Diap2-PEGFP-3-F (5'-GTACTCAGATCTCGAGATGGAGGAGCTCGGGG-3') et Diap2-PEGFP-2-R (5'-TAG ATCCGGTGGATCCTTGGATGACATGGCTCCATTG-3'). Le plasmide receveur a été digéré avec les enzymes de restriction XhoI et BamHI. Le sous-clonage a été réalisé selon le protocole fourni par Takara.

3.9.3. Transfection et extraction des protéines

Environ 500 000 cellules HEK ont été déposées dans chaque puits d'une plaque 6-puits. 16 heures plus tard, la confluence des cellules était comprise entre 60% et 80%. Dans chaque puits, les cellules HEK ont été transfectées avec 6µg de plasmide grâce à 12µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), suivant le protocole fourni par Invritogen. 48 heures après la transfection, les cellules HEK ont été lysées avec le tampon de

lyse. Les lysats ont été récupérés et placés 2 heures sur une roue tournante à 4°C. Les échantillons ont été ensuite centrifugés 20 min à 13 200 rpm, à 4°C. Les surnageants ont été récupérés et placés à -80°C. La concentration en protéines des échantillons a été déterminée grâce à l'utilisation du kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), suivant le protocole fourni.

3.9.4. Western Blot

Chaque échantillon a été préparé à partir de 20 µg de protéine mélangés avec le tampon de charge (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) et 0.05% de β-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Les échantillons ont été préalablement chauffés 5 min à 95°C pour permettre la dénaturation des protéines par le β-mercaptoéthanol. Ils ont ensuite été déposés sur un gel de polyacrylamide 10% (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Après migration, les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Les membranes ont été brièvement nettoyées avec le tampon de lavage et incubées 1 heure dans le tampon de blocage. Les anticorps primaires ont ensuite été ajoutés dans le tampon de blocage et les membranes ont été placées à 4°C pendant la nuit. Les membranes ont été ensuite lavées 5x5 min avec le tampon de lavage. Puis, elles ont été incubées 2 heures dans le tampon de blocage contenant les anticorps secondaires couplées à la peroxydase. Après un dernier lavage de 5x5 min avec le tampon de lavage, les membranes ont été incubées entre 1 et 5 min dans une solution ECL (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Les marquages ont été révélés par exposition aux UV dans une cabine ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4. Résultats

4.1. Les souris Diap3-Tg miment la neuropathie auditive AUNA1

Afin de savoir si notre modèle réplique la neuropathie auditive AUNA1, nous avons tout d'abord mesuré les potentiels évoqués auditifs qui reflètent l'activitée de la voie auditive ascendante. Chez les souris sauvages, les potentiels évoqués auditifs se caractérisent par cinq ondes dont chacune représente l'activité synchrone d'un relais le long de la voie auditive ascendante (voir paragraphe 3.5.1). Chez les souris Diap3-Tg, on observe une diminution progressive de l'amplitude des potentiels évoqués auditifs (Fig. 4.1A,D) ainsi qu'une élévation des seuils auditifs (Fig. 4.1.B,E). A noter que la lignée Tg 771 présente un déficit auditif plus précoce. Nous avons ensuite testé les produits de distorsions acoustiques, indice de l'activité des cellules ciliées externes (CCE). Dans nos expériences, les deux lignées de souris transgéniques montrent des produits de distorsions acoustiques de forte amplitude (Fig. 4.1C,F). Cependant, on note une légère diminution de l'amplitude des produits de distorsions acoustiques chez la lignée Tg 771. L'ensemble de ces résultats montre donc que les souris Diap3-Tg présentent les manifestations d'une neuropathie auditive, à savoir une altération du transfert de l'information sonore avec un fonctionnement normal des CCE.

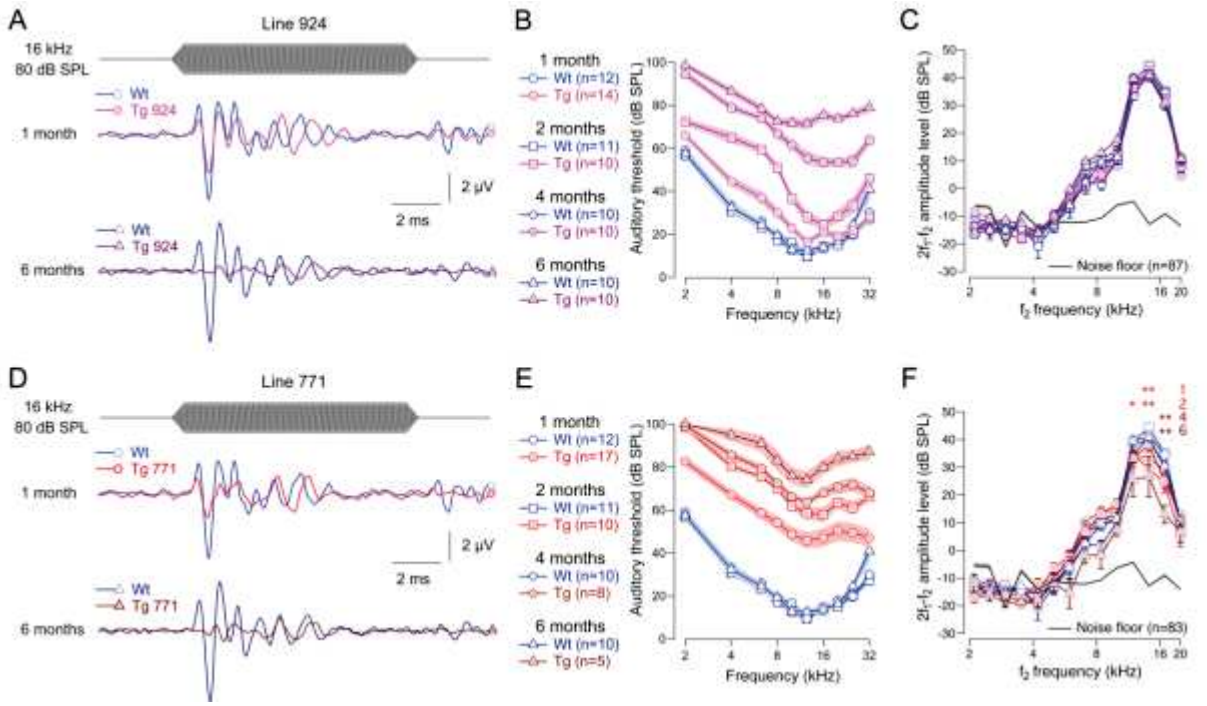


Figure 4.1 : Les souris Diap3-Tg développent une neuropathie auditive progressive. (**A, D**) Potentiels évoqués auditifs enregistrés chez les souris sauvages (A,D), Tg 924 (A) et Tg 771 (D), en présence d'un stimulus sonore de 16 kHz, à 80 dB SPL. (**B, E**) Audiogrammes des souris sauvages (B,E), Tg 924 (B) et Tg 771 (E). (**C, F**) Produits de distorsion acoustiques enregistrés chez les souris sauvages (C,F), Tg 924 (C) et Tg 771 (F) (les chiffres notés en rouge correspondent à l'âge des souris en mois ; *p < 0,05 ; **p < 0,01).

4.2. Perte d'activité des CCI chez les souris Diap3-Tg

Afin de déterminer les structures responsables de la surdité observée chez les souris Diap3-Tg, nous avons mesuré l'activité électrique de la cochlée en électrocochléographie. Nos résultats montrent une diminution de l'amplitude du potentiel d'action composite, qui reflète l'activité synchrone des fibres du nerf auditif, et du potentiel de sommation, qui reflète l'activité des CCI (Fig. 4.2A,C,D). En revanche, le potentiel microphonique, qui reflète l'activité des CCE, n'est pas altéré, en accord avec la présence des produits de distorsions (Fig. 4..2B,E). Ces résultats démontrent donc une atteinte fonctionnelle des CCI chez les souris Diap3-Tg.

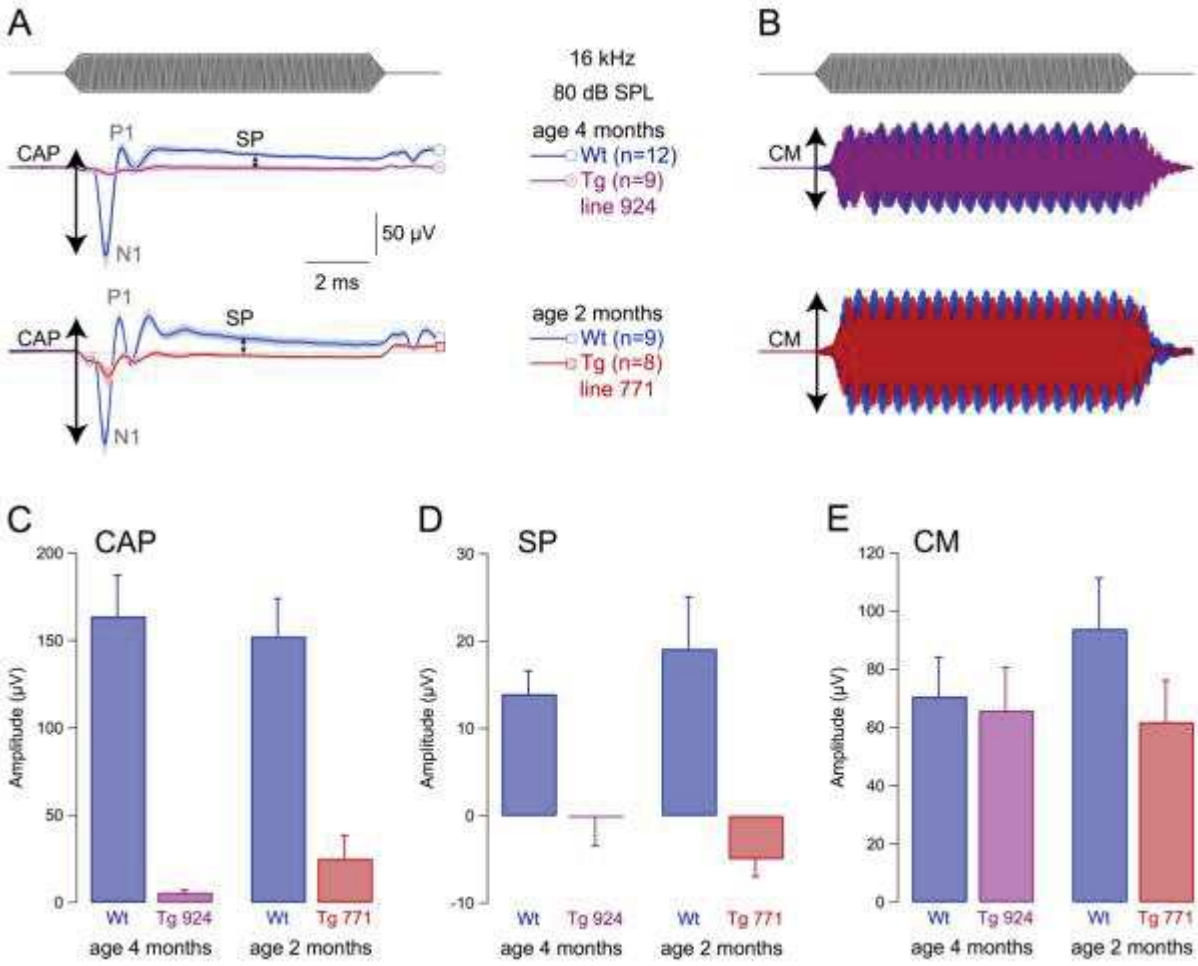


Figure 4.2. : Perte d'activité des CCI chez les souris Diap3-Tg. (A) Potentiel d'action composite (CAP) et potentiel de sommation (SP) enregistrés chez les souris sauvages, Tg 924 et Tg 771, en présence d'un stimulus sonore de 16 kHz à 80 dB SPL. (**B**) Potentiel microphonique (CM) enregistré chez les souris sauvages, Tg 924 et Tg 771, en présence d'un stimulus sonore de 16 kHz à 80 dB SPL. (**C**) Amplitude moyenne du potentiel d'action composite. (**D**) Amplitude moyenne du potentiel de sommation. (**E**) Amplitude moyenne du potentiel microphonique.

4.3. L'activité synaptique des CCI des souris Diap3-Tg est normale

La majorité des neuropathies auditives non-syndromiques est due à une altération de la synapse entre les CCI et les fibres du nerf auditif (Moser et Starr, 2016). Nous avons testé l'activité synaptique des CCI des souris Diap3-Tg en mesurant les courants calciques, l'exocytose et le nombre de synapses. En raison de l'apparition précoce et de la progression rapide de la surdité chez la lignée Tg 771, les mesures ont étés réalisées uniquement sur cette lignée. Les courbes intensité-potentiel du courant Ca^{2+} sont comparables entres les CCI des souris sauvages et Diap3-Tg (Fig 4.3A), ce qui indique que la surexpression de Diap3 n'entraine aucune modification du nombre ou de la dépendance au potentiel des canaux calciques. Pour tester l'exocytose des CCI, nous avons mesuré les variations de la capacité membranaire des CCI, indice de la surface de la membrane plasmique. En réponse à des sauts dépolarisants, l'amplitude de l'exocytose est comparable entre les génotypes (Fig 4.3B-C). Les résultats obtenus montrent que le déficit auditif des souris Diap3-Tg ne provient donc pas d'une altération de la première synapse auditive. En accord avec ces résultats, le même nombre de synapse par CCI entre les souris sauvages et Diap3-Tg a été mesuré en microscopie confocale (Fig 4.3D-F).

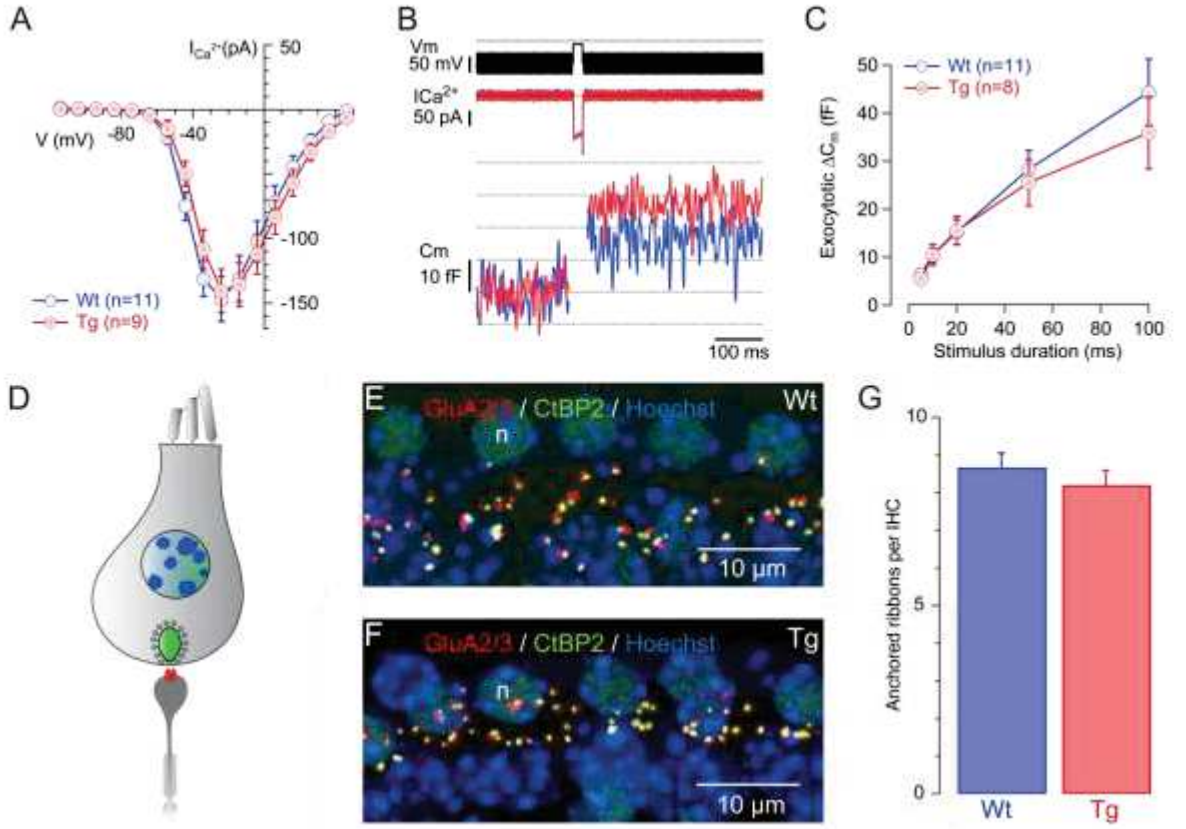


Figure 4.3 : Activité synaptique normale dans les CCI des souris Diap3-Tg. (**A**) Courbe intensité-potentiel du courant Ca^{2+} dans les CCI des souris sauvages (courbe bleue) et Diap3-Tg (courbe rouge). (**B**) Capacité membranaire des CCI des souris sauvages (courbe bleue) et Diap3-Tg (courbe rouge). La dépolarisation induit une augmentation de la capacité membranaire chez les deux lignées. (**C**) Variation de la capacité membranaire en fonction de la durée de dépolarisation dans les CCI des souris sauvages (courbe bleue) et Diap3-Tg (courbe rouge). (**D-F**) Marquages des synapses entre les CCI et les neurones afférents, chez les souris sauvages (E) et Diap3-Tg (F). Le ruban synaptique des CCI est marqué par un anticorps anti-Ctpb2 (en vert), le récepteur GluA/3 sur les neurones afférents est marqué par un anticorps spécifique (en rouge) et le noyau des cellules est marqué par le colorant Hoechst (en bleu). (**G**) Nombre moyen de synapses par CCI chez les souris sauvages et Diap3-Tg.

4.4. Les courants K^+ des CCI des souris Diap3-Tg ne sont pas perturbés

Les courants potassiques sont essentiels au potentiel de récepteur des CCI. Par conséquent, l'altération de l'une des conductances potassiques pourrait être à l'origine de la diminution du potentiel de sommation chez les souris Diap3-Tg. Nous avons mesuré les conductances potassiques des CCI des souris sauvages et des souris Tg 771 âgées de 15 à 21 jours post-nataux. La dépolarisation des CCI provoque, dans un premier temps, l'apparition du courant rapide $I_{K,f}$, et dans un second temps, celle du courant rectifiant retardé $I_{K,s}$. Dans nos expériences, l'amplitude des courants $I_{K,f}$, et $I_{K,s}$ des CCI est identique entre les deux génotypes (Fig. 4.4A-C). Par ailleurs, l'hyperpolarisation des CCI des souris sauvages provoque la désactivation du courant $I_{K,n}$, responsable du maintien de la cellule au potentiel de repos. La désactivation du courant $I_{K,n}$ est également observé dans les CCI des souris Diap3-Tg, indiquant ainsi la préservation de ce courant chez les souris Diap3-Tg (Fig. 4.4D-E). En accord avec la présence d'$I_{k,n}$, le potentiel de membrane est identique entre les lignées sauvage et Tg 771 (Fig. 4.4F). L'ensemble de ces résultats montre donc que l'altération du potentiel de sommation des CCI chez les souris Diap3-Tg ne provient pas d'une perturbation des courants potassiques.

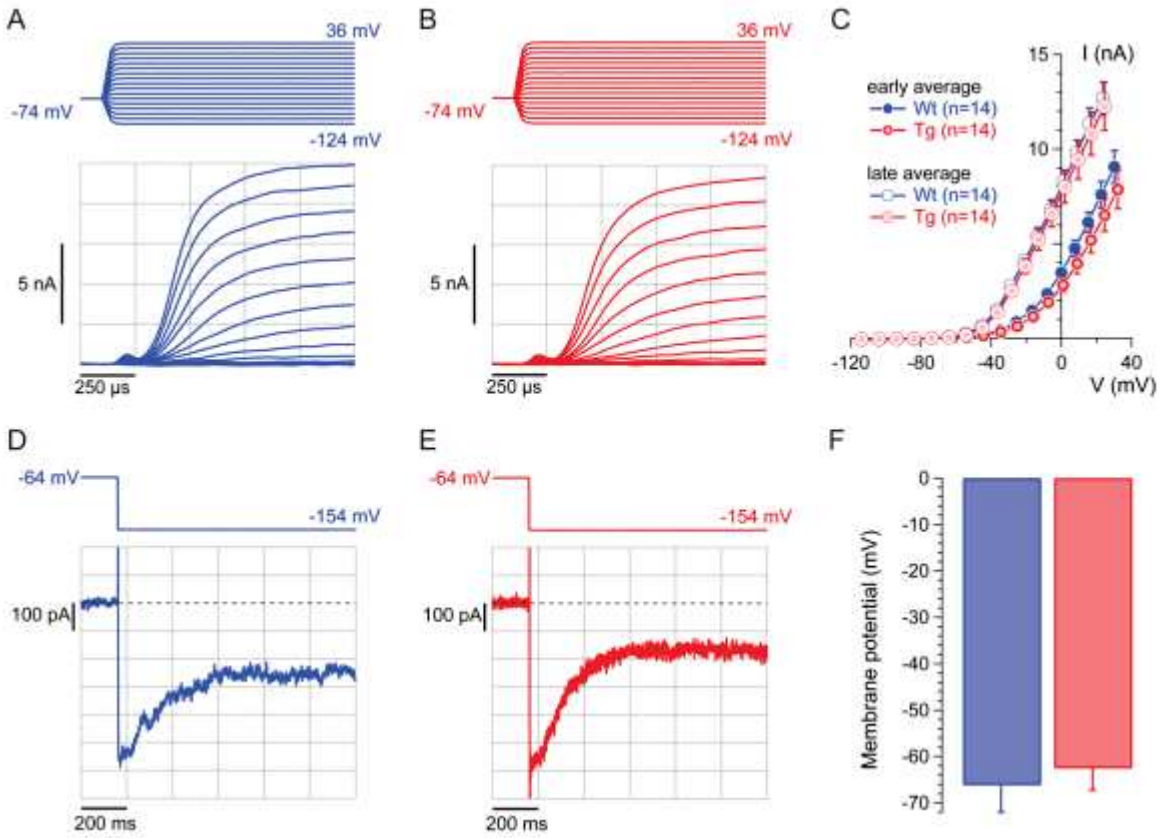


Figure 4.4 : Les courants potassiques des CCI des souris Diap3-Tg ne sont pas perturbés. (**A-B**) Intensité du courant potassique lors d'une dépolarisation dans les CCI des souris sauvages (A) et Diap3-Tg (B). (**C**) Intensités moyennes du courant potassique des CCI en fonction du voltage membranaire. « Early average » correspond à la moyenne obtenue après l'apparition du courant $I_{K,f}$ et « late average » correspond à la moyenne obtenue après l'apparition du courant $I_{K,n}$. (**D-E**) Intensité du courant potassique lors d'une hyperpolarisation dans les CCI des souris sauvages (D) et Diap3-Tg (E). (**F**) Potentiel de membrane des CCI au repos chez les souris sauvages (bleue) et Diap3-Tg (rouge).

4.5. Une fusion des stéréocils est à l'origine de la perte d'activité des CCI des souris Diap3-Tg

Le faisceau de stéréocils des CCI est le siège de la méchanotransduction. De ce fait, une atteinte anatomo-fonctionelle des stéréocils peut être à l'origine de surdités (Self et al., 1999; Goodyear et al., 2003; Kitajiri et al., 2010). Afin de savoir si la surdité AUNA1 est provoquée par une altération des stéréocils, nous avons observé la morphologie du pôle apical des CCI chez les souris Diap3-Tg. Nous avons d'abord examiné la surface de l'organe de Corti en microscopie électronique à balayage. Nos résultats, chez les souris Diap3-Tg, montrent un gonflement au niveau de la plaque cuticulaire des CCI, parfois associé à une fusion des stéréocils. Les CCE, elles, présentent une morphologie semblable à celles des souris sauvages. Nous avons également noté la disparition de quelques cellules ciliées (Fig. 4.5A-I).

Nous avons ensuite observé la morphologie des CCI en microscopie électronique à transmission. Chez les CCI des souris sauvages, les filaments d'actine forment une zone très dense aux électrons dans les stéréocils et la plaque cuticulaire (Fig. 4.5J). Chez les souris sauvages âgées de 4 mois, une légère augmentation du volume de la plaque cuticulaire est parfois visible, pouvant être confondu avec le gonflement observé dans les CCI des souris Diap3-Tg (Fig. 4.5M). Dans certaines CCI des souris Diap3-Tg, les stéréocils sont fusionnés (Fig. 4.5K). Dans d'autres, ils sont invaginés dans le cytoplasme (Fig. 4.5N). La plaque cuticulaire n'apparaît plus comme une zone homogène mais semble déplacée vers la périphérie de la cellule, provoquant un fort gonflement au niveau du pôle apical. A l'inverse, aucune déformation n'est observée dans les CCE (Fig. 4.5L, O).

Nous avons ensuite déterminé les pourcentages de CCI et de CCE présentant des défauts morphologiques. Chez les souris Diap3-Tg, toutes les CCI présentent une plaque cuticulaire gonflée, alors que la proportion de CCI avec des stéréocils fusionnés augmente progressivement avec l'âge. Chez les souris sauvage âgées de 4 mois, nous avons également observé un grand nombre de CCI avec une plaque cuticulaire gonflée. En effet, notre méthode de comptage ne permet pas de différencier entre le fort gonflement du pôle apical observé dans les CCI des souris Diap3-Tg (Fig. 4.5K) et la légère augmentation de volume de la plaque cuticualire qui apparait dans certaines CCI des souris sauvages (Fig. 4.5M). Cependant, le nombre de CCI avec une plaque cuticulaire gonflée reste moins élevé chez les souris sauvages que chez les souris Diap3-Tg. En revanche, la fraction de CCE avec une plaque cuticulaire gonflée et/ou des stéréocils fusionnés reste relativement faible chez les souris Diap3-Tg. Enfin, on observe une perte des CCI et des CCE plus élevée chez les souris Diap3-Tg, par rapport aux souris sauvages (Fig. 4.6A-B).

Afin de déterminer, entre le gonflement de la plaque cuticulaire et l'altération des stéréocils, l'origine de la surdité, nous avons corrélé les défauts morphologiques des cellules ciliées à la perte d'audition. Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre le gonflement de la plaque cuticulaire des CCI et la surdité. En effet, le gonflement de la plaque cuticulaire peut aussi bien être associé à une audition normale qu'à l'absence totale de potentiels auditifs évoqués. En revanche, la perte d'audition augmente de façon exponentielle avec la proportion de CCI présentant des stéréocils fusionnés (Fig. 4.6C). La perte d'activité des CCI chez les souris Diap3-Tg est donc due à l'atteinte des stéréocils. Néanmoins, le rôle supposé de la plaque cuticulaire étant d'assurer le maintien des stéréocils, il est fort probable que le gonflement de la plaque cuticulaire des CCI soit responsable de la fusion des stéréocils et indirectement de la perte auditive des souris Diap3-Tg.

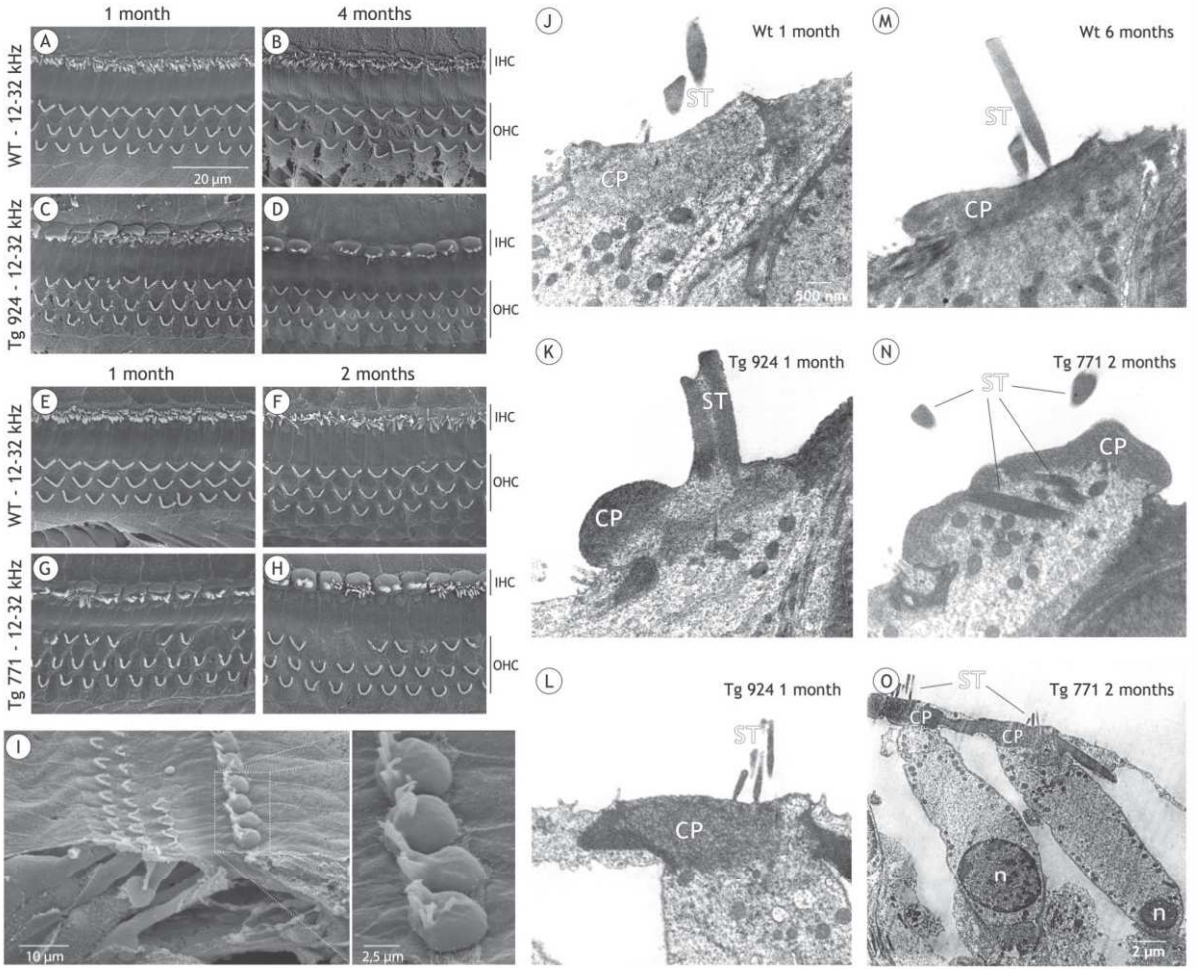


Figure 4.5 : Défauts morphologiques dans la partie apicale des CCI chez les souris Diap3-Tg. (**A-H**) Organe de Corti des souris sauvages (A-B, E-F), Tg 924 (C-D) et Tg 771 (G-H) vu de dessus en microscopie électronique à balayage. Chez les souris Diap3-Tg, les CCI ont des stéréocils fusionnés et une plaque cuticulaire gonflée, alors que les CCE ont une morphologie semblable à celle des souris sauvages. On remarque également une perte de quelques CCE chez les deux lignées Tg 924 et Tg 771. (**I**) Organe de Corti chez la lignée Tg 771 vu de côté en microscopie électronique à balayage. (**J-O**) Coupes sagittales de cellules ciliées en microscopie électronique à transmission. (J, M) CCI de souris sauvages. On observe une légère augmentation du volume de la plaque cuticulaire dans certaines CCI (M). (K, N) CCI des lignées Tg 924 (K) et Tg 771 (N). On observe une fusion des stéréocils et un déplacement de la plaque cuticulaire vers la périphérie (K). Dans certaines CCI, les stéréocils sont invaginés dans le cytoplasme (N). (L, O) CCE des lignées Tg 924 et Tg 771.

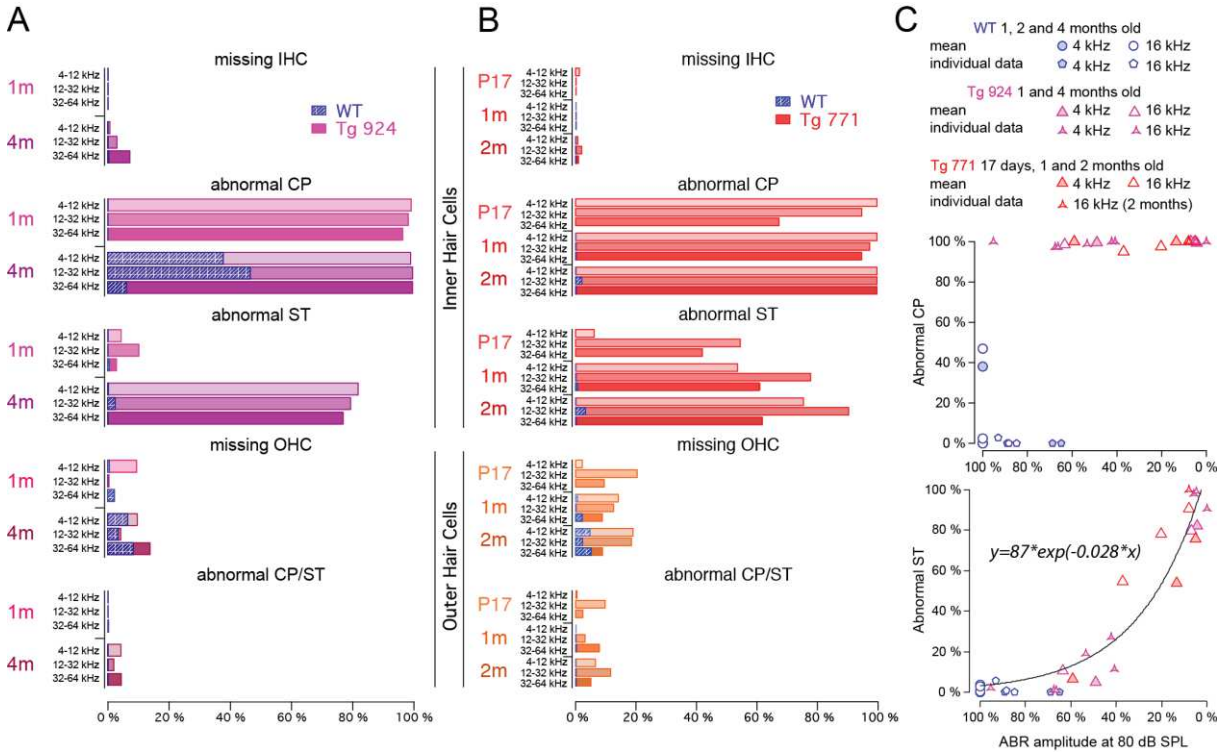


Figure 4.6 : Quantification des défauts morphologiques de la partie apicale des CCI chez les souris Diap3-Tg. (**A-B**) Taux de perte des CCI et des CCE et pourcentages de CCI et de CCE affectées par des défauts morphologiques. (**C**) Le gonflement de la plaque cuticulaire des CCI n'est pas corrélé avec la perte d'audition des souris Diap3-Tg (graphique du haut). En revanche, la perte d'audition augmente de manière exponentielle avec le pourcentage de CCI présentant des stéréocils fusionnés (graphique du bas).

4.6. Déformation de la plaque cuticulaire des CCI chez les souris Diap3-Tg

Nous avons analysé les déformations de la plaque cuticulaire au niveau moléculaire. Pour ce faire, nous avons examiné la distribution de deux constituants majeurs de la plaque cuticulaire, les filaments d'actine et la spectrine, en microscopie confocale. Chez les souris sauvages, ces deux constituants ont une répartition homogène dans l'ensemble de la plaque cuticulaire, à l'exception de l'empreinte du kinocil (Fig. 4.7A-A''). En revanche, chez les souris Diap3-Tg, l'actine et la spectrine sont fortement concentrés à la périphérie du pôle apical (Fig. 4.7B-C''). Ces résultats confirment une atteinte de l'intégrité de la plaque

cuticulaire. La redistribution des constituants de la plaque cuticulaire à la périphérie du pôle apical, pourrait expliquer la perte d'ancrage des stéréocils et par conséquent l'incapacité des CCI à coder les stimulations sonores chez les souris Diap3-Tg.

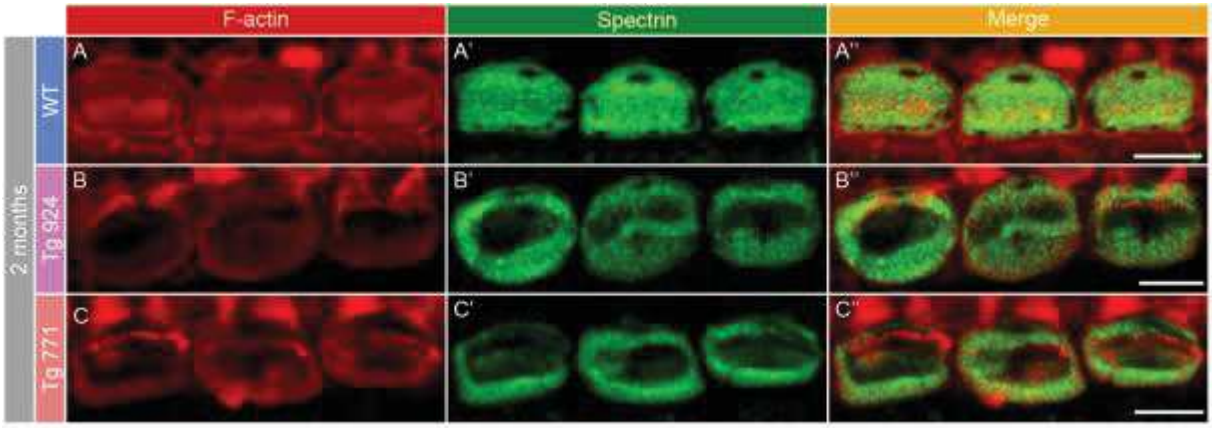


Figure 4.7 : Déformation de la plaque cuticulaire des CCI chez les souris Diap3-Tg. (**A-A"**) Distribution homogène des filaments d'actines (en rouge) et de la spectrine (en vert) dans la plaque cuticulaire des CCI, chez les souris sauvages. (**B-C"**) Concentration des filaments d'actine (en rouge) et de la spectrine (en vert) à la périphérie des CCI chez les souris Tg 924 (B-B'') et Tg 771 (C-C''). Barre d'échelle : 5 µm.

4.7. Remodelage du réseau de microtubule dans les CCI des souris Diap3-Tg

Diap3 est connu pour interagir directement avec les microtubules et assurer leur stabilisation (Palazzo et al., 2001). Il était donc intéressant de savoir si sa surexpression avait un impact sur le réseau de microtubule chez les souris Diap3-Tg. Pour le découvrir, nous avons analysé par immunomarquage l'organisation des microtubules dans la partie apicale des CCI. Les microtubules ont été marqués par un anticorps spécifique de la tubuline β2 et les filaments d'actine par la phalloïdine. Dans les CCI des souris sauvages, les microtubules forment une structure en anneau autour de la plaque cuticulaire (Furness et al., 1990 ; Fig. 4.8A-A'', D-D'', G-G''). Dans les CCI des souris Diap3-Tg, cette structure en anneau est absente et des microtubules sont présents au centre de la plaque cuticulaire, dans la zone

dépourvue d'actine (Fig. 4.8B-C'', E-F'', H-I''). Dans certaines CCI, des microtubules envahissent le faisceau de stéréocil. Le réseau de microtubule subit donc un remodelage dans la partie apicale des CCI des souris Diap3-Tg. L'intensité du marquage de la tubuline β2 augmente avec l'âge chez les souris Diap3-Tg, illustrant une accumulation progressive de microtubule dans la plaque cusiculaire. Cette accumulation de microtubule est plus rapide dans la lignée Tg 711 (Fig. 4.9).

Le marquage des tubulines α1, β1 et β4 montrent également, chez les souris sauvages, une structure en anneau autour de la plaque cuticulaire des CCI, et chez les souris Diap3-Tg, une relocalisation des microtubules à l'intérieur même de la plaque cuticulaire (Fig. 4.10). Ces observations suggèrent donc que tous les isotypes de tubuline subissent le même remodelage.

La présence anormale de microtubules au centre de la plaque cuticulaire pourrait s'expliquer par une stabilisation accrue des microtubules due à la surexpression de Diap3, les protégeant ainsi de la dépolymérisation. Selon cette hypothèse, les microtubules localisés au centre de la plaque cuticulaire des CCI chez les souris Diap3-Tg seraient donc stables. Pour le vérifier, nous avons réalisé un marquage de la tubuline α-acétylée ou de la tubuline α-détyrosinée, caractéristiques des microtubules stables, avec un co-marquage de tous les microtubules par l'anticorps anti-tubuline α1 précédemment utilisé. Nous avons observé une superposition des deux marquages dans les CCI des Diap3-Tg, démontrant ainsi que les microtubules anormalement localisés dans le centre de la plaque cuticulaire sont stables (marquage α-acétylée : Fig. 4.11 ; marquage α-détyrosinée : résultats non montrés).

Ces résultats favorisent l'hypothèse selon laquelle la surexpression de Diap3 entraînerait une accumulation de microtubules stables au centre de la plaque cuticulaire, provoquant ainsi un remodelage du réseau de microtubule dans la partie apicale des CCI.

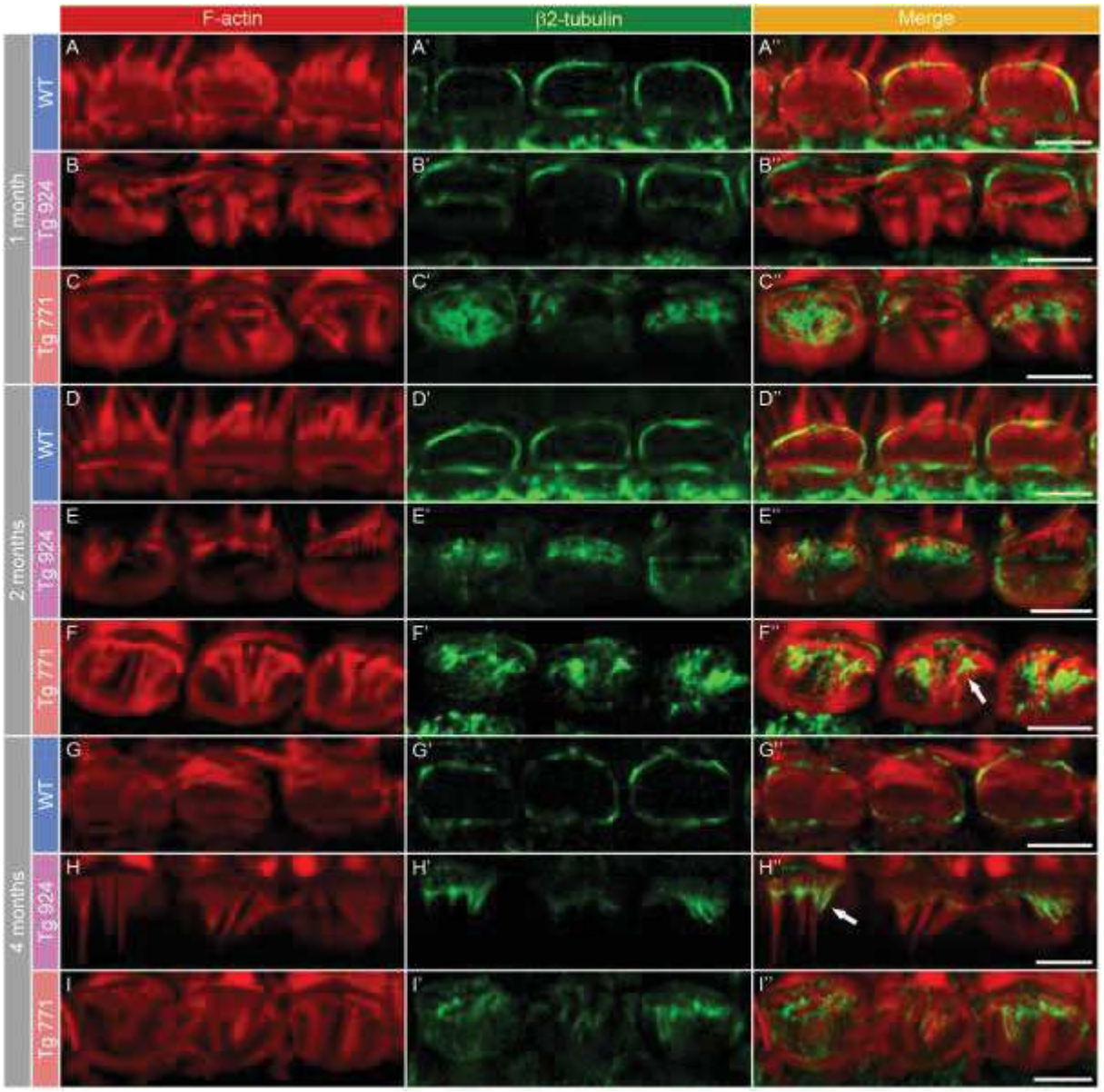


Figure 4.8 : Remodelage du réseau de microtubule dans les CCI des souris Diap3-Tg. (**A-A", D-D", G-G"**) Distribution des microtubules (marqués par un anticorps anti-tubuline β2 en vert) autour de la plaque cuticulaire (filaments d'actine marqués par la phalloïdine en rouge) dans les CCI des souris sauvages, à 1 mois (A-A''), 2 mois (D-D'') et 4 mois (G-G''). (**B-C", E-F", H-I"**) Réorganisation des microtubules (marqués par un anticorps anti-tubuline β2 en vert) qui envahissent la plaque cuticulaire (filaments d'actine marqués par la phalloïdine en rouge) et parfois même les stéréocils (flèches) dans les CCI des souris Tg 924 à 1 mois (B-B''), 2 mois (E-E'') et 4 mois (H-H'') et Tg 771 à 1 mois (C-C''), 2 mois (F-F'') et 4 mois (I-I''). Barre d'échelle : 5 µm.

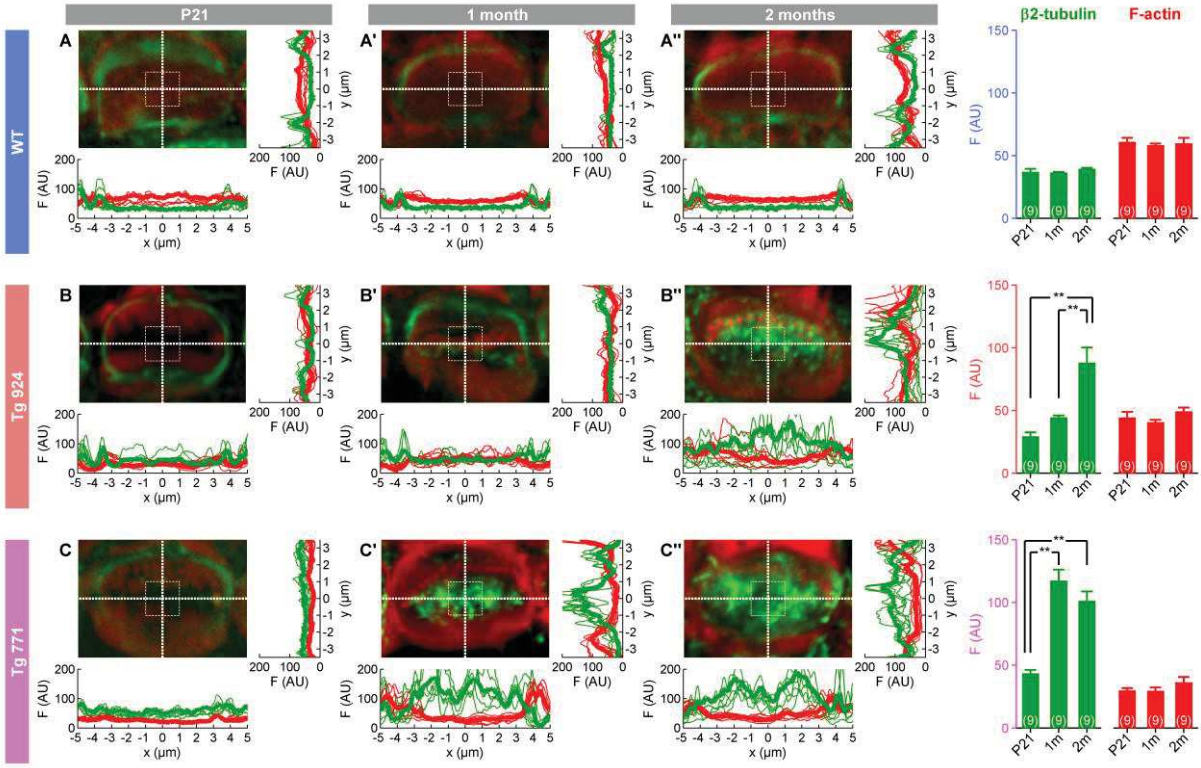


Figure 4.9 : Quantification des marquages de tubuline et d'actine dans les CCI des souris sauvages et Diap3-Tg. (**A-A"**) Chez les souris sauvages âgées de 21 jours post-nataux (A), 1 mois (A') et 2 mois (A''), le marquage d'actine est plus intense que le marquage de la tubuline β2 à l'intérieur même de la plaque cuticulaire. Inversement le marquage de la tubuline β2 est plus intense que le marquage d'actine autour de la plaque cuticulaire. L'histogramme montre que l'intensité des deux marquages ne varie pas entre les différents âges. (**B-C"**) Chez les souris Tg 924 âgées de 21 jours post-nataux (B), 1 mois (B') et 2 mois (B'') et Tg 771 âgées de 21 jours post-nataux (C), 1 mois (C') et 2 mois (C''), le marquage de la tubuline β2 devient plus intense que le marquage d'actine à l'intérieur même de la plaque cuticulaire, à 1 mois chez les souris Tg 924, et à P21 chez les souris Tg 771. L'histogramme montre que l'intensité du marquage de la tubuline β2 augmente avec l'âge des souris, illustrant une accumulation de microtubule à l'intérieur de la plaque cuticulaire.

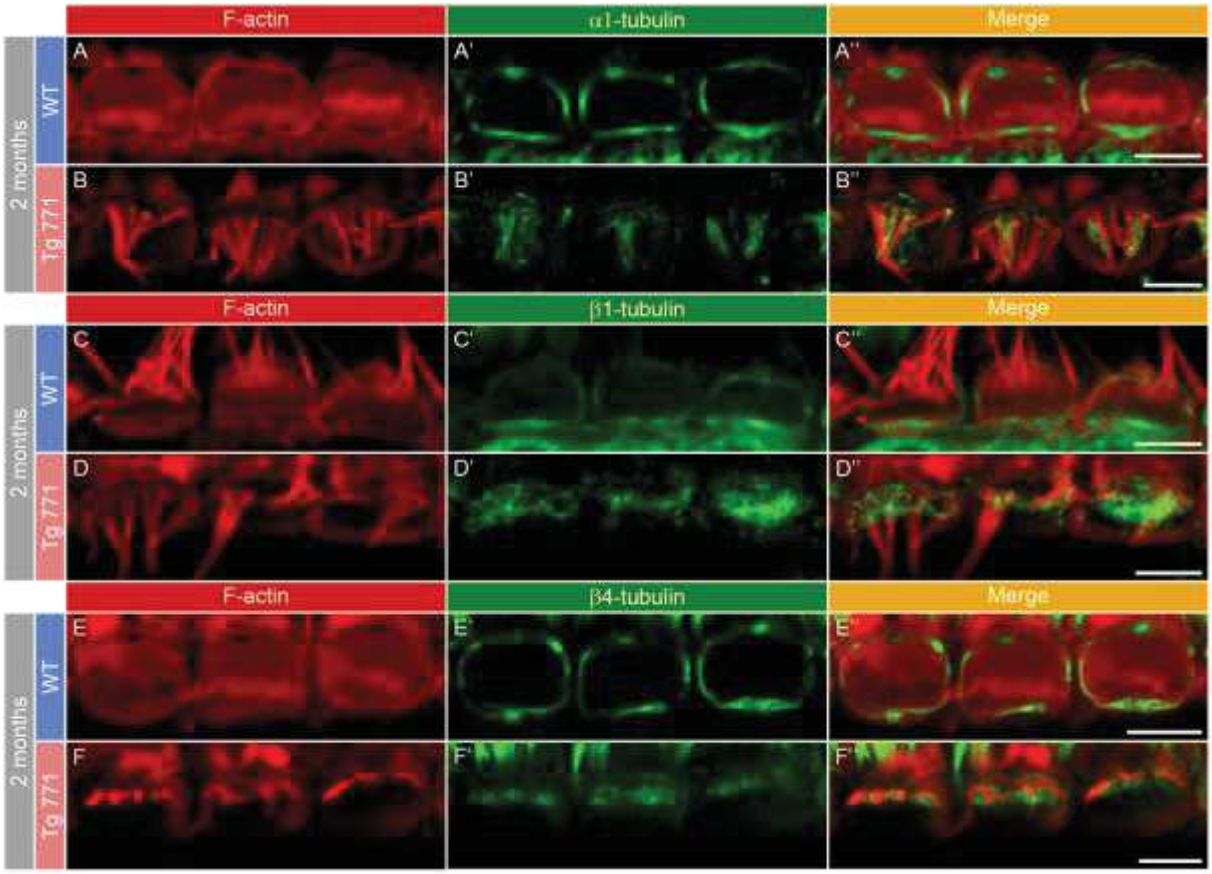


Figure 4.10 : Les tubulines α1, β1 et β4 subissent la même redistribution que la tubuline β2 chez les souris Diap3-Tg. (**A-A", C-C", E-E"**) Distribution des tubulines α1 (A'), β1 (C') et β4 (E') (en vert) autour de la plaque cuticulaire (filaments d'actine marqués par la phalloïdine en rouge) dans les CCI des souris sauvages. (**B-B", D-D", F-F"**) Distribution des tubulines α1 (B'), β1 (D') et β4 (F') (en vert) à l'intérieur de la plaque cuticulaire (filaments d'actine marqués par la phalloïdine en rouge) dans les CCI des souris Tg 771. Barre d'échelle : 5 µm.

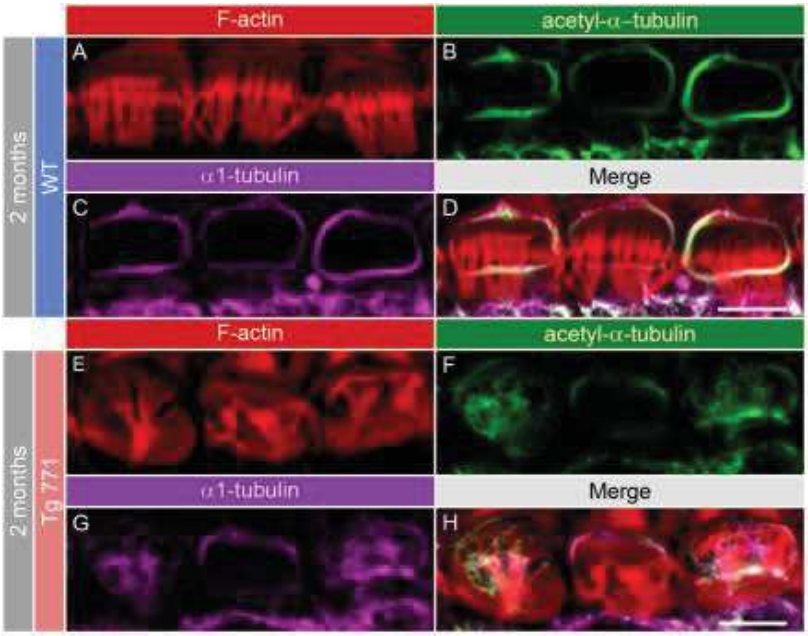


Figure 4.11 : Les micro-tubules dans la partie apicale des CCI sont stables. (**A-D**) Colocalisation des tubulines α-acétylée (en vert) et α1 (en magenta) autour de la plaque cuticulaire des CCI chez les souris sauvages. Les filaments d'actine sont marqués par la phalloïdine (en rouge). (**E-H**) Colocalisation des tubulines α-acétylée (en vert) et α1 (en magenta) à l'intérieur de la plaque cuticulaire dans les CCI des souris Diap3-Tg. Les filaments d'actine sont marqués par la phalloïdine en rouge. Barre d'échelle : 5 µm.

4.8. La réorganisation des microtubules dans les CCI des souris Diap3-Tg commence avant l'apparition de la surdité

Si la réorganisation des microtubules est responsable du gonflement de la plaque cuticulaire, ce phénomène devrait s'amorcer au moment de l'apparition de la perte auditive, voire avant. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons observé l'organisation des microtubules à 10, 15 et 21 jours post-nataux (P10, P15 et P21). A P10, quelques jours avant l'entrée en fonction de la cochlée, les seuls microtubules visibles dans les CCI des souris sauvages et Diap3-Tg, sont localisés à l'emplacement du kinocil (Fig. 4.12A-C''). A P15, lors de l'entrée en fonction de la cochlée, les microtubules forment une structure en anneau autour de la plaque cuticulaire des CCI des souris sauvages (Fig. 4.12D-D''). Aucun microtubule n'est présent à l'emplacement du kinocil maintenant disparu. Cette organisation est donc identique à celle précédemment décrite chez les souris adultes. Dans les CCI des souris Diap3-Tg, les microtubules arborent la même organisation que dans les CCI des souris sauvages. Toutefois, dans un certain nombre de CCI, des microtubules supplémentaires sont visibles au milieu de la plaque cuticulaire, illustrant l'amorçage de la réorganisation des microtubules (Fig. 4.12E-F''). A P21, quelques jours après l'entrée en fonction de la cochlée, le réseau de microtubule dans les CCI des souris sauvages maintient son organisation, à savoir une structure en anneau autour de la plaque cuticulaire (Fig. 4.12G-G''). Dans les CCI des souris Diap3-Tg, en revanche, le réseau de microtubules poursuit son remodelage. Dans une large fraction de CCI, des microtubules sont visibles au centre de la plaque cuticulaire alors que les microtubules encerclant la plaque cuticulaire semblent se désolidariser (Fig. 4.12H-I''). L'ensemble de ces résultats montre donc que le remodelage du réseau de microtubule dans les CCI des souris Diap3-Tg commence avant l'élévation des seuils auditifs et se poursuit avec la progression de la surdité.

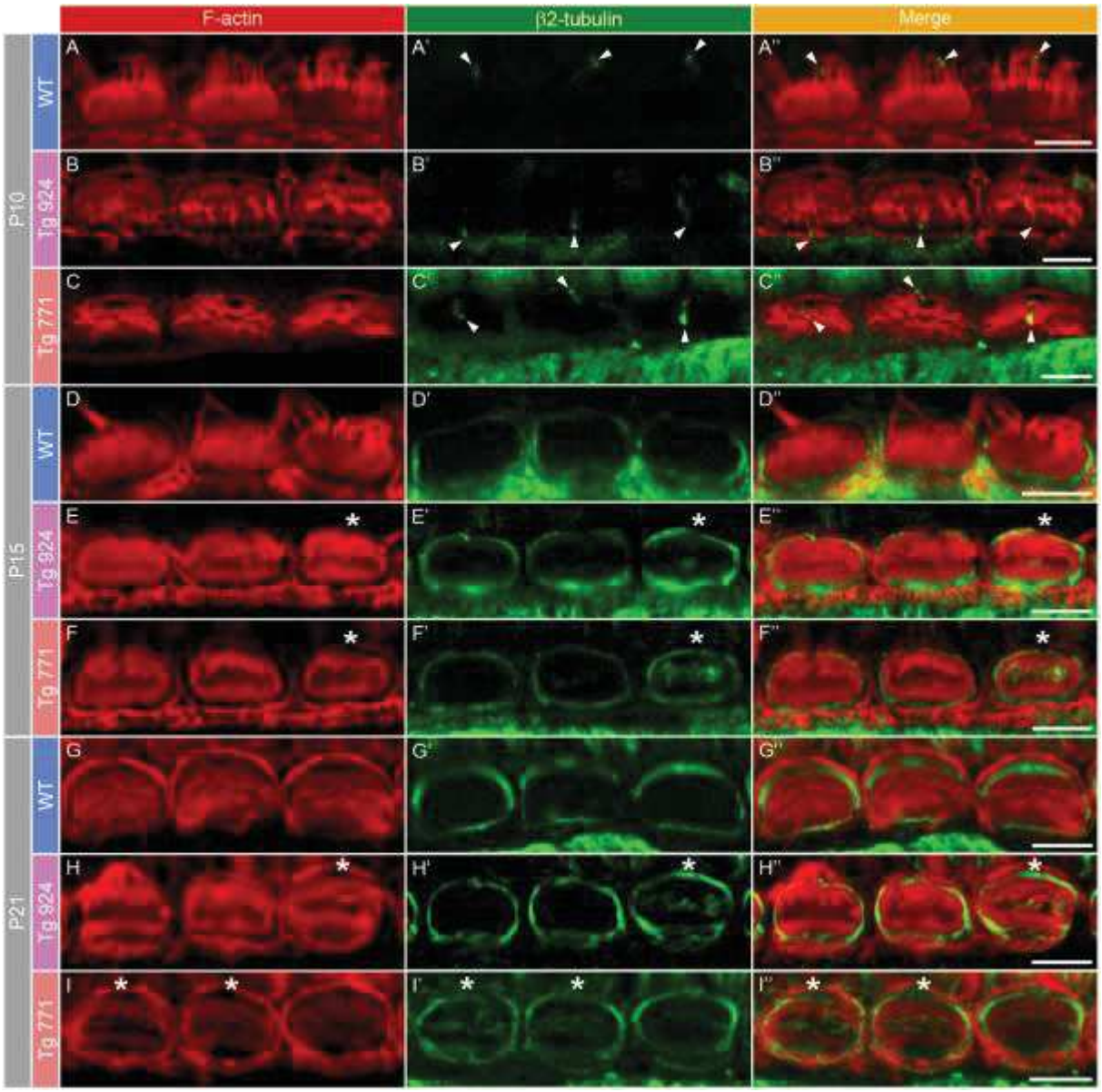


Figure 4.12 : La réorganisation des microtubules débute dès l'entrée en fonction de la cochlée. (**A-C''**) A 10 jours post-nataux, dans la partie apicale des CCI des souris sauvages (A-A''), Tg 924 (B-B'') et Tg 771 (C-C''), les seuls microtubules présents (marqués par un anticorps anti-tubuline β2 en vert) sont localisés au niveau du kinocil (têtes de fléche). Les filaments d'actine sont marqués par la phalloïdine (en rouge). (**D-F''**) A 15 jours post-nataux, dans les CCI des souris sauvages (D-D''), Tg 924 (E-E'') et Tg 771 (F-F''), les microtubules (marqués par un anticorps anti-tubuline β2 en vert) sont distribués autour de la plaque cuticulaire. Les filaments d'actine sont marqués par la phalloïdine (en rouge). Chez les souris Diap3-Tg, des microtubules supplémentaires sont visibles au centre de la plaque cuticulaire de certaines CCI (étoiles). (**G-I''**) A 21 jours post-nataux, dans les CCI des souris sauvages (G-G''), la structure en anneau de microtubules (marqués par un anticorps anti-tubuline β2 en vert) est maintenu autour de la plaque cuticulaire. Les filaments d'actine sont marqués par la phalloïdine en rouge. Dans les CCI des souris Tg 924 (H-H'') et Tg 771 (I-I''), cette structure en anneau est partiellement désorganisée. De plus, des microtubules supplémentaires sont visibles au centre de la plaque cuticulaire dans une partie des CCI (étoiles). Barre d'échelle : 5 µm.

4.9. Diap3 est localisée dans la plaque cuticulaire des CCI

Si la protéine Diap3 est directement responsable de la réorganisation des microtubules dans les CCI des souris Diap3-Tg, alors celle-ci devrait se localiser dans la plaque cuticulaire des CCI. Pour valider cette hypothèse, nous avons étudié la localisation de Diap3 dans l'organe de Corti en microscopie confocale. La difficulté de cette expérience a été de trouver un anticorps spécifique de Diap3. En effet, la séquence protéique de Diap3 présente une forte homologie avec celles des protéines Diap1 et Diap2. Pour pallier à ce problème, nous avons conçus un nouvel anticorps reconnaissant un antigène présent dans la protéine Diap3 mais absent des protéines Diap1 et Diap2 (Fig 4.13A). Pour tester la spécificité de cet anticorps, nous avons réalisé un marquage de Diap3 en western blot sur des extraits protéiques de cellules HEK surexprimant les protéines Diap1, Diap2 ou Diap3 fusionnés avec une protéine GFP. Nos résultats confirment que notre anticorps anti-Diap3 reconnait la protéine Diap3 mais pas les protéines Diap1 et Diap2 (Fig. 4.13B). Chez les souris sauvages, Diap3 est très présente dans les deux populations de cellules ciliées. Dans les CCE, elle est située au niveau des stéréocils mais n'est pas détectée dans la plaque cuticulaire (Fig. 4.13A-A''). Dans les CCI, en revanche, elle est localisée à la fois dans les stéréocils et la plaque cuticulaire (Fig. 4.13B-B''). De même, chez les souris Diap3-Tg, la protéine est présente dans les CCE au niveau des stéréocils uniquement et dans les CCI au niveau des stéréocils et de la plaque cuticulaire (Fig. 4.13C-F''). Ces résultats démontrent que Diap3 est présente dans la plaque cuticulaire des CCI, lesquelles subissent un remodelage du cytosquelette, mais n'est pas présente dans la plaque cuticulaire des CCE, qui, elles, conservent une organisation adéquate de son réseau de microtubule. Ces résultats favorisent donc l'hypothèse d'une action directe de Diap3 sur les microtubules. La différence de localisation de Diap3 entre les deux contingents de cellules ciliées expliquerait l'atteinte spécifique des CCI.

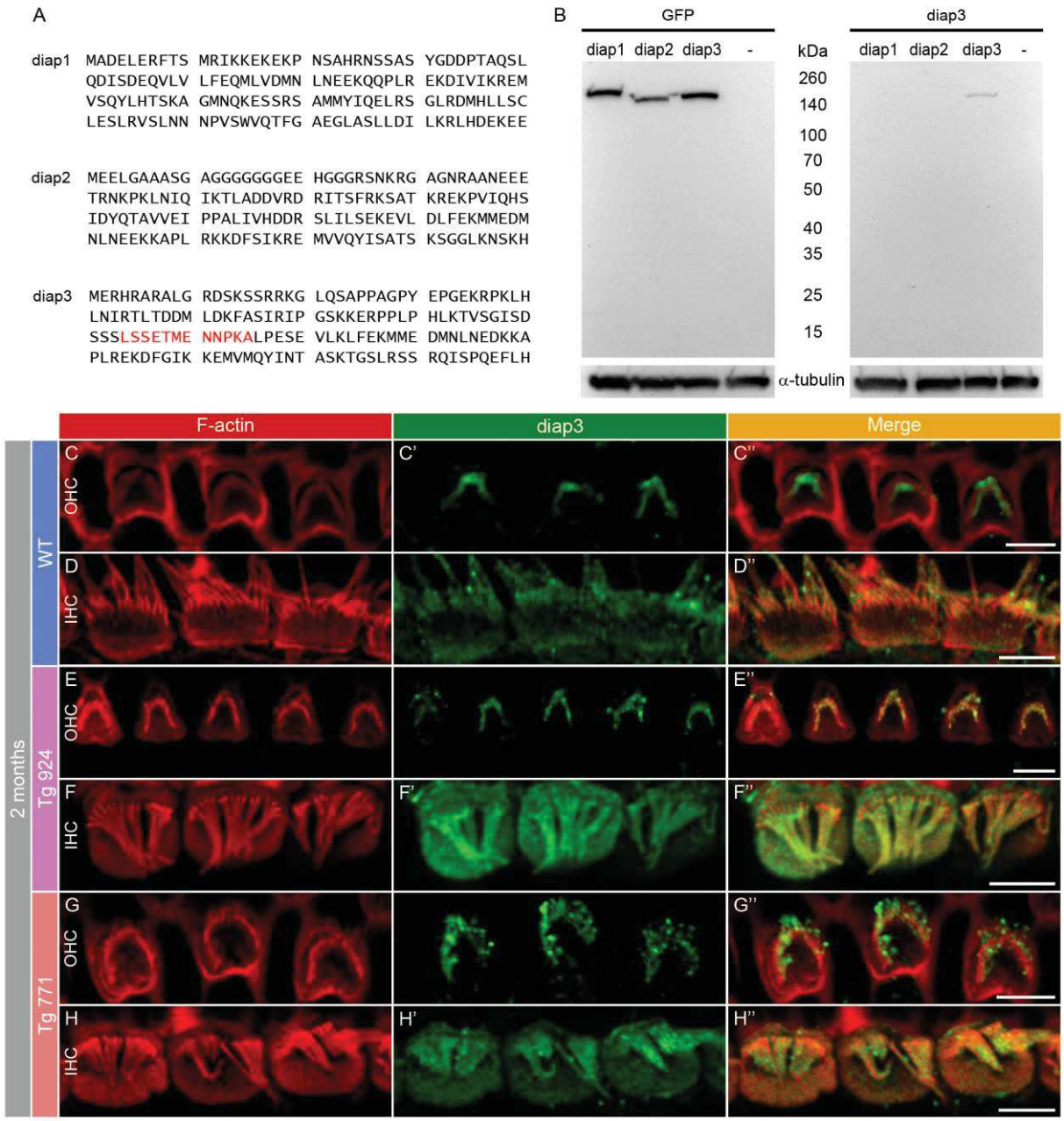


Figure 4.13 : Diap3 est localisée dans la plaque cuticulaire des CCI. (**A**) Les 120 premiers acides animés de la séquence protéique de chaque protéine Diap murine. En rouge, l'antigène reconnu par l'anticorps anti-Diap3. (**B**) Western Blot sur des extraits protéiques de cellules HEK surexprimant les protéines Diap1, Diap2 ou Diap3 fusionnés avec une protéine GFP. Le marquage GFP confirme l'expression des trois protéines Diap dans les cellules HEK (à gauche ; ~160kDa). '-' correspondant aux cellules HEK non transfectées. Le marquage Diap3 confirme que l'anticorps anti-Diap3 reconnait la protéine Diap3 mais pas les protéines Diap1 et Diap2 (à droite). Les marquages α-Tubulines permettent d'estimer la quantité totale de protéine présente dans chaque condition. (**C-C'', E-E'', G-G''**) Dans les CCE des souris sauvages (C-C''), Tg 924 (E-E'') et Tg 771 (G-G''), Diap3 (en vert) est localisée dans les stéréocils. Les filaments d'actines sont marqués par la phalloïdine (en rouge). (**D-D'', F-F'', H-H''**) Dans les CCI des souris sauvages (D-D''), Tg 924 (F-F'') et Tg 771 (H-H''), Diap3 (en vert) est localisée à la fois dans les stéréocils et la plaque cuticulaire. Les filaments d'actines sont marqués par la phalloïdine (en rouge). Barre d'échelle : 5 µm.

5. Discussion

Dans cette étude, nous avons démontré que les souris transgéniques surexprimant *Diap3* présentent les caractéristiques de la neuropathie auditive humaine AUNA1, à savoir une surdité progressive associée à une activité normale des CCE. Le déficit auditif est du à une atteinte des CCI. La libération du glutamate et les courants potassiques ne sont pas altérés chez les souris transgéniques. Cependant, nous avons observé des défauts morphologiques au pôle apical des CCI, à savoir une déformation de la plaque cuticulaire et une fusion des stéréocils. La localisation aberrante de microtubule au centre de la plaque cuticulaire suggère qu'un remodelage du réseau de microtubule est à l'origine de la déformation de cette structure et est ainsi responsable de la surdité AUNA1.

5.1. Remodelage du réseau de microtubule dans les CCI des souris Diap3-Tg

Diap3 appartient à la famille des formines, qui est connue pour promouvoir la nucléation et l'élongation des filaments d'actine ainsi que la stabilisation des microtubules (Ishizaki et al., 2001; Palazzo et al., 2001; Pruyne et al., 2002; Wen et al., 2004; Bartolini et al., 2008). Nous avons montré que, chez les souris sauvages, Diap3 est préférentiellement localisée dans les stéréocils des CCI et CCE ainsi que dans la plaque cuticulaire des CCI. En accord avec nos résultats, une récente étude protéomique a permis d'identifer Diap3 parmi les protéines constitutives des stéréocils dans les cellules ciliées vestibulaires de la souris (Krey et al., 2015). Etant donné l'abondance d'actine dans la partie apicale des cellules ciliées (Flock and Cheung, 1977; Slepecky and Chamberlain, 1985; Furness et al., 2005), Diap3 pourrait être un composant intégral de l'appareil mécanotransducteur, jouant un rôle clé dans

le renouvellement de l'actine (Schneider et al., 2002; Zhang et al., 2012; Drummond et al., 2015).

Chez les souris Diap3-Tg, la protéine Diap3 est également présente dans les stéréocils des cellules ciliées et la plaque cuticulaire des CCI. La surexpression de *diap3* ne modifie donc pas la localisation de la protéine mais résulterait plutôt en une accumulation de Diap3 dans la partie apicale des cellules ciliées. Ainsi, la surproduction de Diap3 pourrait entraîner une polymérisation plus importante de filament d'actine (Ishizaki et al., 2001; Pruyne et al., 2002). Dans ce scénario, l'excès d'actine engendrerait une hypertrophie de la plaque cuticulaire, correspondant au gonflement du pôle apical observée en microscopie électronique. Toutefois, dans un tel scénario, la distribution d'actine serait homogène dans la plaque cuticulaire. Or, nos résultats révèlent, au contraire, une zone dépourvue d'actine et de spectrine au centre de la plaque cuticulaire. Par ailleurs, cette zone est envahie par des microtubules. Ainsi, l'accumulation de Diap3 aurait donc pour effet de stabiliser préférentiellement des microtubules dans une région non appropriée. Cet excès de microtubules pourrait en retour exercer une contrainte physique sur la plaque cuticulaire et la déplacer vers la périphérie. Les microtubules présents au centre de la plaque cuticulaire pourraient provenir du contingent de microtubule qui entoure la plaque cuticulaire. Cependant, nous n'avons pas observé de marquage continu de la tubuline entre les microtubules organisés en anneau autour de la plaque cuticulaire et les microtubules occupant le centre de la plaque cuticulaire. Nos résultats suggèrent plutôt que Diap3 en excès stabiliserait des microtubules déjà présents dans la plaque cuticulaire. Ces microtubules proviendraient des colonnes de microtubules qui émergent du cytoplasme pour venir s'insérer dans la plaque cuticulaire (Jaeger et al., 1994; Antonellis et al., 2014).

Il est intéressant de noter que trois mutations de la protéine DIAPH1 sont à l'origine de surdité (Lynch et al., 1997; Stritt et al., 2016; Ueyama et al., 2016). Ces mutations sont

toutes localisées dans la partie C-terminal de DIAPH1, laquelle comporte le domaine auto-inhibiteur DAD. Il a été prouvé qu'au moins deux de ces mutations abolissent l'auto-inhibition de DIAPH1, conduisant ainsi une forme constitutivement active de la protéine (Stritt et al., 2016; Ueyama et al., 2016). Chez les souris Diap1-Tg surexprimant le gène *DIAPH1* muté, les CCI et CCE arborent des stéréocils fusionnés. Mais contrairement aux souris Diap3-Tg, ces souris présentent une perte relativement importante de CCE, conduisant à une baisse de l'amplitude des otoémissions acoustiques (Ueyama et al., 2016). Ainsi, l'ensemble de ces données et de nos propres résultats démontrent que les protéines DIAPH1/Diap1 et DIAPH3/Diap3 sont toutes deux nécessaires au maintient des stéréocils dans les cellules ciliées de la cochlée. Cependant des différences notables entre les souris Diap3-Tg et les souris Diap1-Tg, notamment l'altération du faisceau de stéréocils des CCE et l'absence de déformation de la plaque cuticulaire des CCI chez les souris Diap1-Tg, suggèrent que les deux protéines jouent un rôle différent sur le cytosquelette des cellules ciliées.

5.2. La surexpression de *Diap3* perturbe la mécanotransduction des CCI

La majorité des neuropathies auditives non-syndromiques est due à un défaut de la machinerie synaptique (Moser et Starr, 2016). Or, chez les souris Diap3-Tg, le recyclage synaptique et le nombre de ruban synaptique ne sont pas affectés, ce qui, comme décrit précédemment (Schoen et al., 2013), exclut une perturbation de l'activité synaptique à l'origine de la surdité AUNA1. Les défauts majeurs observés chez les souris Diap3-Tg résident plutôt dans la partie apicale des CCI, ces défauts sont une déformation de la plaque cuticulaire et une fusion des stéréocils. Ces anomalies causent probablement une altération de l'activité du canal mécanotransducteur (Beurg et al., 2009). La corrélation entre les défauts

morphologiques et l'élévation du seuil auditif montre que la surdité ne provient pas de la déformation de la plaque cuticulaire mais de la fusion des stéréocils. Cependant, le rôle supposé de la plaque cuticulaire étant d'assurer l'ancrage des stéréocils (DeRosier et Tilney, 1989; Furness et al., 2008; Vranceanu et al., 2012), la déformation de cette structure est, fort probablement, à l'origine de la fusion des stéréocils (Liberman, 1987; Kitajiri et al., 2010) et par conséquent de la surdité AUNA1. Il est possible aussi que la réorganisation des microtubules provoque directement la fusion des stéréocils comme le suggèrent certains de nos marquages qui montrent une invasion du faisceau de stéréocils par les microtubules. Par ailleurs, la matrice dense de microtubule à la base des stéréocils pourrait interférer avec le transport intracellulaire entre les stéréocils et le cytoplasme (Schneider et al., 2002; Zhang et al., 2012; Drummond et al., 2015). Ainsi, l'atteinte du faisceau de stéréocils pourrait modifier le comportement du canal mécanotransducteur. Ce dernier étant fortement dépendant de la déflection des stéréocils (Kozlov et al., 2011).

5.3. L'atteinte spécifique des CCI

Il est assez surprenant de constater que la surexpression du gène *Diap3* affecte uniquement les CCI alors que celui-ci est exprimé dans les deux populations de cellules ciliées. Ceci pourrait être dû au fait que Diap3 soit localisée dans la plaque cuticulaire des CCI mais pas dans celle des CCE. En effet, l'absence de colocalisation de Diap3 avec les microtubules de la plaque cuticulaire des CCE protégerait ce contingent de cellules ciliées des effets délétères de la surexpression de *Diap3*. Mais comment expliquer alors la différence de localisation de Diap3 entre les CCI et CCE ? Diap3 pourrait être adressée dans la plaque cuticulaire des CCI via un partenaire qui serait 1) exprimé dans les CCI, 2) absent des CCE et

3) localisé dans la plaque cuticulaire. En suivant cette hypothèse, nous avons tenté d'isoler une protéine partenaire de Diap3 répondant à ces critères. Pour cela, nous avons sous-traité la réalisation d'un crible par double-hybride afin d'identifer les partenaires de Diap3 dans l'oreille interne. Ce crible par double-hybride a été réalisé à partir d'une banque d'ARNm issue du vestibule dont les cellules ciliées présentent elles aussi un gonflement de la plaque cuticulaire (données non montrées). Au total, ce crible a permis d'identifier 106 interactants (Diagr. 5.1). Ensuite, nous avons réalisé, à partir de cette liste d'interactants, un crible par immunomarquage afin d'identifier les protéines exprimées spécifiquement dans les CCI et localisées dans la plaque cuticulaire. Pour restreindre le nombre de protéines à tester, nous avons établis deux listes de protéines candidates : les complexes RhoGTPases, connues pour activer les formines (liste « activateurs »), et les protéines associées au cytosquelette (liste « effecteurs ») (Table 5.1) (Evangelista et al., 2003; Wallar and Alberts, 2003; Goode and Eck, 2007; Bartolini and Gundersen, 2010). La liste « activateurs » a été complétée par l'ajout des RhoGTPases RhoA, RhoB, Rac1 et Cdc42 qui sont absentes des résultats du crible par double-hybride mais connues pour réguler l'activité de Diap3 dans d'autres systèmes (Alberts et al., 1998; Wallar et al., 2007; Ji et al., 2008). Nos résultats en immunomarquages montrent que toutes les protéines candidates de la liste « activateurs » sont exprimées à la fois dans les CCI et les CCE. Parmi les 13 protéines candidates de la liste « effecteurs », 12 sont exprimées à la fois dans les CCI et CCE. Seule la protéine Amphiphysine semble être spécifiquement exprimée dans les CCI. L'immunomarquage de l'Amphiphysine indique une localisation autour de la plaque cuticulaire des CCI et semble être absente dans les CCE (Fig. 5.1). L'Amphiphysine répond donc à nos deux premiers critères de sélection. Cependant, sa localisation n'est pas modifiée dans les CCI des souris Diap3-Tg (résultats non montrés). L'Amphiphysine ne semble donc pas être impliquée dans l'adressage de Diap3, ni dans le remodelage de réseau de microtubules.

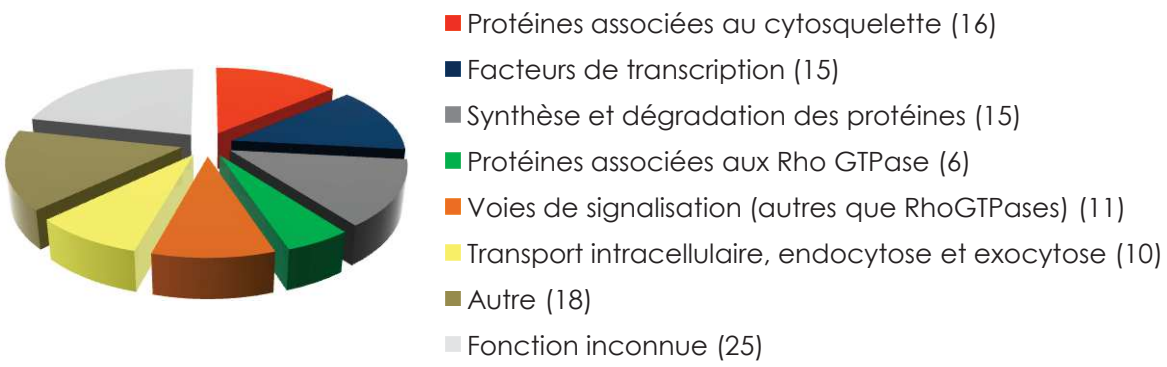


Diagramme 5.1 : Répartition des interactants de Diap3 selon leurs fonctions. Entre parenthèse, le nombre de protéines répertoriées dans chaque catégorie.

Nom usuel	Fonction(s)
Liste "activateurs" (RhoGTPases et protéines associées)	
Arhgap4	Active certaines RhoGTPases
Rab3gap2	Active Rab3
Rgl1	Active les RalGTPases
Rgl2	Active les RalGTPases
Rgl3	Active les RalGTPases
Srgap1	Inhibe Rac1
RhoA	RhoGTPase
RhoB	RhoGTPase
Rac1	RhoGTPase
Cdc42	RhoGTPase
Liste effecteurs (protéines associées au cytosquelette)	
Shootine1	Se lit aux filaments d'actine, induit divers processus (croissance axonale, migration, etc.)
Amphiphysine	Facteur de nucléation des filaments d'actine
Apc	Stabilise les microtubules
Apc2	Stabilise les microtubules
Arfgef2	Echange GTD/GTP dans le complexe ARF1/ARF5/ARF6 (nucléateur de filaments d'actine)
Diap1	Facteur de nucléation des filaments d'actine, stabilise les microtubules
Diap2	Facteur de nucléation des filaments d'actine
Dystonine	Se lit aux filaments d'actine et aux microtubules, stabilise certaines structures cellulaires
Fmnl2	Facteur de nucléation des filaments d'actine
Herc2	Stabilise les centrosomes
HEF1	Favorise la polymérisation des filaments d'actine
Pericentrine	Recrute la tubuline au centrosome
Plectine	Protéine d'échaffaudage liée aux microtubules et aux filaments d'actine
Spectrine	Stabilise le cytosquellette
Nesprine-2	Lie les filaments d'actine au noyau

Table 5.1 : Listes « activateurs » et « effecteurs ». En vert, les RhoGTPases absentes de la liste d'interactants mais connues pour réguler l'activité de Diap3. En rouge, les protéines Diap1 et Diap2 éliminées de la liste « effecteurs » faute d'anticorps spécifiques.

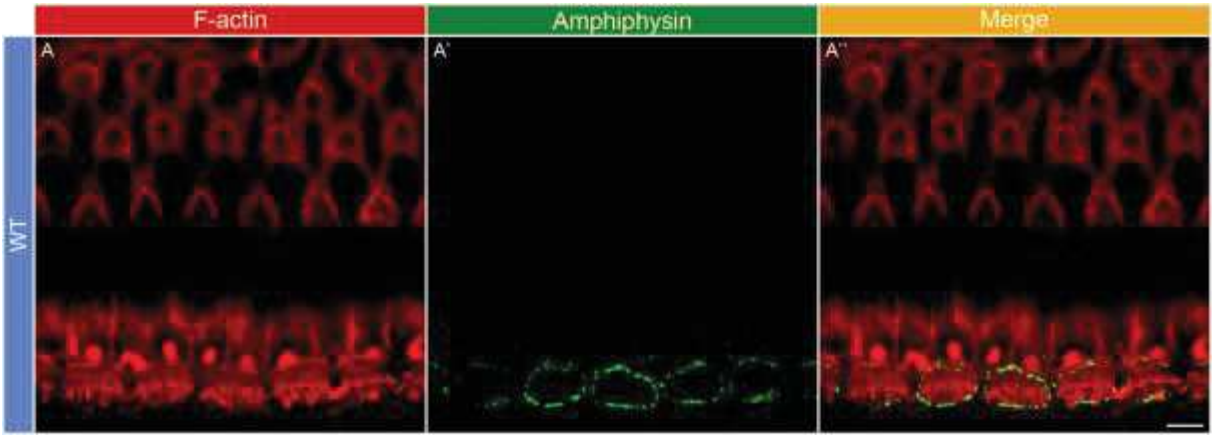


Figure 5.1 : La protéine Amphiphysine est spécifique des CCI. La protéine Amphysine (en vert) est localisée autour de la plaque cuticulaire des CCI chez les souris sauvages. Les filaments d'actine sont marqués par la phalloïdine (en rouge). Barre d'échelle : 5 µm.

Alternativement, l'atteinte spécifique des CCI pourrait s'expliquer par un inhibiteur de Diap3 exprimé dans les CCE et absent des CCI, ce qui protégerait ainsi les CCE d'une activité excessive de Diap3. Enfin, un taux insuffisant de renouvellement des protéines dans les CCI pourrait expliquer une accumulation plus importante de Diap3 dans ces cellules. En effet, les CCE éliminerait plus facilement un excès de Diap3 grâce à un processus d'ubiquitination plus efficace (DeWard et Alberts, 2009).

5.4. Les souris Diap3-Tg miment la neuropathie auditive humaine AUNA1

Pour élucider les mécanismes de la neuropathie auditive AUNA1, causée par une surexpression du gène *DIAPH3*, nous avons étudié les souris transgéniques surexprimant le gène murin *Diap3* (Schoen et al., 2013). Nos résultats démontrent que les souris Diap3-Tg répliquent les caractéristiques de la surdité AUNA1, à savoir une perte auditive progressive sans altération des CCE. Chez la lignée Tg 771, nous avons constaté une élévation plus rapide des seuils auditifs et une légère réduction des oto-émissions acoustiques. Cette dernière

pourrait être due à une perte plus importante de CCE dans cette lignée. De plus, la diminution du potentiel de sommation, les défauts morphologiques et le remodelage du réseau de microtubule sont plus précoce et progressent plus rapidement dans la lignée Tg 771. Ceci pourrait être du à un niveau d'expression plus élevé de *Diap3* dans la ligné Tg 771 du fait d'un nombre de copie plus important du transgène inséré dans le génome (8 copies dans la lignée Tg 771 ; 6 dans la lignée Tg 924). Dans cette hypothèse, au-dessus d'un certain niveau d'expression de *Diap3*, les défauts anatomiques ne serait plus restreint aux CCI mais toucherait également les CCE, conduisant finalement à la dégénération de ces dernières. Toutefois, la quantité d'ARNm de Diap3 est similaire entre les deux génotypes (Schoen et al., 2013). Il est également possible qu'un site d'insertion du transgène différent entre les deux lignées puisse avoir un impact différent dans la survie des CCE.

5.5. Conclusion

A travers cette étude, nous avons identifié les mécanismes moléculaires de la neuropathie auditive AUNA1. Ceci constitue une étape primordiale pour le développement d'un traitement en faveur des personnes atteintes de cette surdité. De plus, au-delà d'élucider les mécanismes d'AUNA1, notre étude dévoile ne nouvelle cause des neuropathies auditives, à savoir la ciliopathie spécifique des CCI.

6. Références

Ahmed ZM, Riazuddin S, Ahmad J, Bernstein SL, Guo Y, Sabar MF, Sieving P, Griffith AJ, Friedman TB, Belyantseva IA, Wilcox ER (2003) PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. Hum Mol Genet 12:3215-3223.

Alberts AS, Bouquin N, Johnston LH, Treisman R (1998) Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein beta subunits and the yeast response regulator protein Skn7. J Biol Chem 273:8616-8622.

Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS, Wissinger B (2000) OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. Nat Genet 26:211-215.

Amatuzzi MG, Northrop C, Liberman MC, Thornton A, Halpin C, Herrmann B, Pinto LE, Saenz A, Carranza A, Eavey RD (2001) Selective inner hair cell loss in premature infants and cochlea pathological patterns from neonatal intensive care unit autopsies. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 127:629-636.

Antonellis PJ, Pollock LM, Chou SW, Hassan A, Geng R, Chen X, Fuchs E, Alagramam KN, Auer M, McDermott BM, Jr. (2014) ACF7 is a hair-bundle antecedent, positioned to integrate cuticular plate actin and somatic tubulin. J Neurosci 34:305-312.

Arima T, Uemura T, Yamamoto T (1987) Three-dimensional visualizations of the inner ear hair cell of the guinea pig. A rapid-freeze, deep-etch study of filamentous and membranous organelles. Hear Res 25:61-68.

Ashmore J (2008) Cochlear outer hair cell motility. Physiol Rev 88:173-210.

Assad JA, Shepherd GM, Corey DP (1991) Tip-link integrity and mechanical transduction in vertebrate hair cells. Neuron 7:985-994.

Attias J, Raveh E, Aizer-Dannon A, Bloch-Mimouni A, Fattal-Valevski A (2012) Auditory system dysfunction due to infantile thiamine deficiency: long-term auditory sequelae. Audiol Neurootol 17:309-320.

Baig SM, Koschak A, Lieb A, Gebhart M, Dafinger C, Nurnberg G, Ali A, Ahmad I, Sinnegger-Brauns MJ, Brandt N, Engel J, Mangoni ME, Farooq M, Khan HU, Nurnberg P, Striessnig J, Bolz HJ (2011) Loss of Ca(v)1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. Nat Neurosci 14:77-84.

Bartolini F, Gundersen GG (2010) Formins and microtubules. Biochim Biophys Acta 1803:164-173.

Bartolini F, Moseley JB, Schmoranzer J, Cassimeris L, Goode BL, Gundersen GG (2008) The formin mDia2 stabilizes microtubules independently of its actin nucleation activity. J Cell Biol 181:523-536.

Bashtanov ME, Goodyear RJ, Richardson GP, Russell IJ (2004) The mechanical properties of chick (Gallus domesticus) sensory hair bundles: relative contributions of structures sensitive to calcium chelation and subtilisin treatment. J Physiol 559:287-299.

Beurg M, Fettiplace R, Nam JH, Ricci AJ (2009) Localization of inner hair cell mechanotransducer channels using high-speed calcium imaging. Nat Neurosci 12:553-558.

Brandt A, Striessnig J, Moser T (2003) CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. J Neurosci 23:10832-10840.

Chaib H, Place C, Salem N, Chardenoux S, Vincent C, Weissenbach J, El-Zir E, Loiselet J, Petit C (1996) A gene responsible for a sensorineural nonsyndromic recessive deafness maps to chromosome 2p22-23. Hum Mol Genet 5:155-158.

Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquellec L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. Nat Genet 26:207-210.

Dememes D, Scarfone E (1992) Fodrin immunocytochemical localization in the striated organelles of the rat vestibular hair cells. Hear Res 61:155-160.

DeRosier DJ, Tilney LG (1989) The structure of the cuticular plate, an in vivo actin gel. J Cell Biol 109:2853-2867.

DeWard AD, Alberts AS (2009) Ubiquitin-mediated degradation of the formin mDia2 upon completion of cell division. J Biol Chem 284:20061-20069.

Drummond MC, Barzik M, Bird JE, Zhang DS, Lechene CP, Corey DP, Cunningham LL, Friedman TB (2015) Live-cell imaging of actin dynamics reveals mechanisms of stereocilia length regulation in the inner ear. Nat Commun 6:6873.

Duncker SV, Franz C, Kuhn S, Schulte U, Campanelli D, Brandt N, Hirt B, Fakler B, Blin N, Ruth P, Engel J, Marcotti W, Zimmermann U, Knipper M (2013) Otoferlin couples to clathrin-mediated endocytosis in mature cochlear inner hair cells. J Neurosci 33:9508-9519.

Evangelista M, Zigmond S, Boone C (2003) Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. J Cell Sci 116:2603-2611.

Ferre M, Bonneau D, Milea D, Chevrollier A, Verny C, Dollfus H, Ayuso C, Defoort S, Vignal C, Zanlonghi X, Charlin JF, Kaplan J, Odent S, Hamel CP, Procaccio V, Reynier P, Amati-Bonneau P (2009) Molecular screening of 980 cases of suspected hereditary optic neuropathy with a report on 77 novel OPA1 mutations. Hum Mutat 30:E692-705.

Fettiplace R, Hackney CM (2006) The sensory and motor roles of auditory hair cells. Nat Rev Neurosci 7:19-29.

Fettiplace R, Kim KX (2014) The physiology of mechanoelectrical transduction channels in hearing. Physiol Rev 94:951-986.

Flock A, Cheung HC (1977) Actin filaments in sensory hairs of inner ear receptor cells. J Cell Biol 75:339-343.

Francis SP, Krey JF, Krystofiak ES, Cui R, Nanda S, Xu W, Kachar B, Barr-Gillespie PG, Shin JB (2015) A short splice form of Xin-actin binding repeat containing 2 (XIRP2) lacking the Xin repeats is required for maintenance of stereocilia morphology and hearing function. J Neurosci 35:1999-2014.

Friedmann I, Cawthorne T, McLay K, Bird ES (1963) Electron Microscopic Observations on the Human Membranous Labyrinth with Particular Reference to M'eni'ere's Disease. J Ultrastruct Res 49:123-138.

Furness DN, Hackney CM, Steyger PS (1990) Organization of microtubules in cochlear hair cells. J Electron Microsc Tech 15:261-279.

Furness DN, Katori Y, Mahendrasingam S, Hackney CM (2005) Differential distribution of beta- and gamma-actin in guinea-pig cochlear sensory and supporting cells. Hear Res 207:22-34.

Furness DN, Mahendrasingam S, Ohashi M, Fettiplace R, Hackney CM (2008) The dimensions and composition of stereociliary rootlets in mammalian cochlear hair cells: comparison between high- and low-frequency cells and evidence for a connection to the lateral membrane. J Neurosci 28:6342-6353.

Goode BL, Eck MJ (2007) Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. Annu Rev Biochem 76:593-627.

Goodyear RJ, Legan PK, Wright MB, Marcotti W, Oganesian A, Coats SA, Booth CJ, Kros CJ, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Richardson GP (2003) A receptor-like inositol lipid phosphatase is required for the maturation of developing cochlear hair bundles. J Neurosci 23:9208-9219.

Greene CC, McMillan PM, Barker SE, Kurnool P, Lomax MI, Burmeister M, Lesperance MM (2001) DFNA25, a novel locus for dominant nonsyndromic hereditary hearing impairment, maps to 12q21-24. Am J Hum Genet 68:254-260.

Griguer C, Lehouelleur J, Valat J, Sahuquet A, Sans A (1993) Voltage dependent reversible movements of the apex in isolated guinea pig vestibular hair cells. Hear Res 67:110-116.

Haeseleer F, Imanishi Y, Maeda T, Possin DE, Maeda A, Lee A, Rieke F, Palczewski K (2004) Essential role of Ca2+-binding protein 4, a Cav1.4 channel regulator, in photoreceptor synaptic function. Nat Neurosci 7:1079-1087.

Hangen E, Blomgren K, Benit P, Kroemer G, Modjtahedi N (2010) Life with or without AIF. Trends Biochem Sci 35:278-287.

Hasson T, Gillespie PG, Garcia JA, MacDonald RB, Zhao Y, Yee AG, Mooseker MS, Corey DP (1997) Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. J Cell Biol 137:1287-1307.

Haustein MD, Read DJ, Steinert JR, Pilati N, Dinsdale D, Forsythe ID (2010) Acute hyperbilirubinaemia induces presynaptic neurodegeneration at a central glutamatergic synapse. J Physiol 588:4683-4693.

Henry WR, Mulroy MJ (1995) Afferent synaptic changes in auditory hair cells during noise-induced temporary threshold shift. Hear Res 84:81-90.

Hirokawa N (1986) Cytoskeletal architecture of the chicken hair cells revealed with the quick-freeze, deep-etch technique. Hear Res 22:41-54.

Hirokawa N, Tilney LG (1982) Interactions between actin filaments and between actin filaments and membranes in quick-frozen and deeply etched hair cells of the chick ear. J Cell Biol 95:249-261.

Hudspeth AJ (1982) Extracellular current flow and the site of transduction by vertebrate hair cells. J Neurosci 2:1-10.

Ishizaki T, Morishima Y, Okamoto M, Furuyashiki T, Kato T, Narumiya S (2001) Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. Nat Cell Biol 3:8-14.

Jaeger RG, Fex J, Kachar B (1994) Structural basis for mechanical transduction in the frog vestibular sensory apparatus: II. The role of microtubules in the organization of the cuticular plate. Hear Res 77:207-215.

Jaramillo F, Hudspeth AJ (1991) Localization of the hair cell's transduction channels at the hair bundle's top by iontophoretic application of a channel blocker. Neuron 7:409-420.

Ji P, Jayapal SR, Lodish HF (2008) Enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts requires Rac GTPases and mDia2. Nat Cell Biol 10:314-321.

Johnson SL, Beurg M, Marcotti W, Fettiplace R (2011) Prestin-driven cochlear amplification is not limited by the outer hair cell membrane time constant. Neuron 70:1143-1154.

Jung S, Maritzen T, Wichmann C, Jing Z, Neef A, Revelo NH, Al-Moyed H, Meese S, Wojcik SM, Panou I, Bulut H, Schu P, Ficner R, Reisinger E, Rizzoli SO, Neef J, Strenzke N, Haucke V, Moser T (2015) Disruption of adaptor protein 2mu (AP-2mu) in cochlear hair cells impairs vesicle reloading of synaptic release sites and hearing. EMBO J 34:2686-2702.

Kabzinska D, Korwin-Piotrowska T, Drechsler H, Drac H, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kochanski A (2007) Late-onset Charcot-Marie-Tooth type 2 disease with hearing impairment associated with a novel Pro105Thr mutation in the MPZ gene. Am J Med Genet A 143A:2196-2199.

Kazmierczak P, Sakaguchi H, Tokita J, Wilson-Kubalek EM, Milligan RA, Muller U, Kachar B (2007) Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. Nature 449:87-91.

Kennedy HJ, Crawford AC, Fettiplace R (2005) Force generation by mammalian hair bundles supports a role in cochlear amplification. Nature 433:880-883.

Kikkawa YS, Pawlowski KS, Wright CG, Alagramam KN (2008) Development of outer hair cells in Ames waltzer mice: mutation in protocadherin 15 affects development of cuticular plate and associated structures. Anat Rec (Hoboken) 291:224-232.

Kimura RS (1975) The ultrastructure of the organ of Corti. Int Rev Cytol 42:173-222.

Kirkim G, Serbetcioglu B, Erdag TK, Ceryan K (2008) The frequency of auditory neuropathy detected by universal newborn hearing screening program. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 72:1461-1469.

Kitajiri S, Sakamoto T, Belyantseva IA, Goodyear RJ, Stepanyan R, Fujiwara I, Bird JE, Riazuddin S, Ahmed ZM, Hinshaw JE, Sellers J, Bartles JR, Hammer JA, 3rd, Richardson GP, Griffith AJ, Frolenkov GI, Friedman TB (2010) Actin-bundling protein TRIOBP forms resilient rootlets of hair cell stereocilia essential for hearing. Cell 141:786-798.

Kovach MJ, Campbell KC, Herman K, Waggoner B, Gelber D, Hughes LF, Kimonis VE (2002) Anticipation in a unique family with Charcot-Marie-Tooth syndrome and deafness: delineation of the clinical features and review of the literature. Am J Med Genet 108:295-303.

Kozlov AS, Baumgart J, Risler T, Versteegh CP, Hudspeth AJ (2011) Forces between clustered stereocilia minimize friction in the ear on a subnanometre scale. Nature 474:376-379.

Krey JF, Sherman NE, Jeffery ED, Choi D, Barr-Gillespie PG (2015) The proteome of mouse vestibular hair bundles over development. Sci Data 2:150047.

Kuhn S, Geyer M (2014) Formins as effector proteins of Rho GTPases. Small GTPases 5:e29513.

Lee HY, Raphael PD, Park J, Ellerbee AK, Applegate BE, Oghalai JS (2015) Noninvasive in vivo imaging reveals differences between tectorial membrane and basilar membrane traveling waves in the mouse cochlea. Proc Natl Acad Sci U S A 112:3128-3133.

Legan PK, Lukashkina VA, Goodyear RJ, Kossi M, Russell IJ, Richardson GP (2000) A targeted deletion in alpha-tectorin reveals that the tectorial membrane is required for the gain and timing of cochlear feedback. Neuron 28:273-285.

Leung CL, Sun D, Zheng M, Knowles DR, Liem RK (1999) Microtubule actin cross-linking factor (MACF): a hybrid of dystonin and dystrophin that can interact with the actin and microtubule cytoskeletons. J Cell Biol 147:1275-1286.

Liberman MC (1987) Chronic ultrastructural changes in acoustic trauma: serial-section reconstruction of stereocilia and cuticular plates. Hear Res 26:65-88.

Liberman MC, Tartaglini E, Fleming JC, Neufeld EJ (2006) Deletion of SLC19A2, the high affinity thiamine transporter, causes selective inner hair cell loss and an auditory neuropathy phenotype. J Assoc Res Otolaryngol 7:211-217.

Liberman MC, Gao J, He DZ, Wu X, Jia S, Zuo J (2002) Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. Nature 419:300-304.

Lumpkin EA, Hudspeth AJ (1995) Detection of Ca2+ entry through mechanosensitive channels localizes the site of mechanoelectrical transduction in hair cells. Proc Natl Acad Sci U S A 92:10297-10301.

Lynch ED, Lee MK, Morrow JE, Welcsh PL, Leon PE, King MC (1997) Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the Drosophila gene diaphanous. Science 278:1315-1318.

Marlin S, Feldmann D, Nguyen Y, Rouillon I, Loundon N, Jonard L, Bonnet C, Couderc R, Garabedian EN, Petit C, Denoyelle F (2010) Temperature-sensitive auditory neuropathy associated with an otoferlin mutation: Deafening fever! Biochem Biophys Res Commun 394:737-742.

Moser T, Starr A (2016) Auditory neuropathy--neural and synaptic mechanisms. Nat Rev Neurol 12:135-149.

Neef J, Gehrt A, Bulankina AV, Meyer AC, Riedel D, Gregg RG, Strenzke N, Moser T (2009) The Ca2+ channel subunit beta2 regulates Ca2+ channel abundance and function in inner hair cells and is required for hearing. J Neurosci 29:10730-10740.

Nicholson-Tomishima K, Ryan TA (2004) Kinetic efficiency of endocytosis at mammalian CNS synapses requires synaptotagmin I. Proc Natl Acad Sci U S A 101:16648-16652.

Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B (2010) Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). Biochem Biophys Res Commun 396:95-100.

Nouvian R, Beutner D, Parsons TD, Moser T (2006) Structure and function of the hair cell ribbon synapse. J Membr Biol 209:153-165.

Nouvian R, Neef J, Bulankina AV, Reisinger E, Pangrsic T, Frank T, Sikorra S, Brose N, Binz T, Moser T (2011) Exocytosis at the hair cell ribbon synapse apparently operates without neuronal SNARE proteins. Nat Neurosci 14:411-413.

Oishi K, Hofmann S, Diaz GA, Brown T, Manwani D, Ng L, Young R, Vlassara H, Ioannou YA, Forrest D, Gelb BD (2002) Targeted disruption of Slc19a2, the gene encoding the high-affinity thiamin transporter Thtr-1, causes diabetes mellitus, sensorineural deafness and megaloblastosis in mice. Hum Mol Genet 11:2951-2960.

Palazzo AF, Cook TA, Alberts AS, Gundersen GG (2001) mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. Nat Cell Biol 3:723-729.

Pangrsic T, Lasarow L, Reuter K, Takago H, Schwander M, Riedel D, Frank T, Tarantino LM, Bailey JS, Strenzke N, Brose N, Muller U, Reisinger E, Moser T (2010) Hearing requires otoferlin-dependent efficient replenishment of synaptic vesicles in hair cells. Nat Neurosci 13:869-876.

Pawlowski KS, Kikkawa YS, Wright CG, Alagramam KN (2006) Progression of inner ear pathology in Ames waltzer mice and the role of protocadherin 15 in hair cell development. J Assoc Res Otolaryngol 7:83-94.

Perrin BJ, Sonnemann KJ, Ervasti JM (2010) beta-actin and gamma-actin are each dispensable for auditory hair cell development but required for Stereocilia maintenance. PLoS Genet 6:e1001158.

Pickles JO, Comis SD, Osborne MP (1984) Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. Hear Res 15:103-112.

Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H, Striessnig J (2000) Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca2+ channels. Cell 102:89-97.

Pollock LM, McDermott BM, Jr. (2015) The cuticular plate: a riddle, wrapped in a mystery, inside a hair cell. Birth Defects Res C Embryo Today 105:126-139.

Polster BM (2013) AIF, reactive oxygen species, and neurodegeneration: a "complex" problem. Neurochem Int 62:695-702.

Poskanzer KE, Marek KW, Sweeney ST, Davis GW (2003) Synaptotagmin I is necessary for compensatory synaptic vesicle endocytosis in vivo. Nature 426:559-563.

Pruyne D, Evangelista M, Yang C, Bi E, Zigmond S, Bretscher A, Boone C (2002) Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. Science 297:612-615.

Puel J, Durrieu J, Rebillard G, Vidal D, Assié R, Uziel A (1995) Comparison between auditory brainstem responses and distortion products otoacoustic emissions after temporary threshold shift in guinea pig. Acta Acustica 3:75-82.

Puel JL, Pujol R, Ladrech S, Eybalin M (1991) Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid electrophysiological and neurotoxic effects in the guinea-pig cochlea. Neuroscience 45:63-72.

Puel JL, Ruel J, Gervais d'Aldin C, Pujol R (1998) Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss. Neuroreport 9:2109-2114.

Rance G, Starr A (2015) Pathophysiological mechanisms and functional hearing consequences of auditory neuropathy. Brain 138:3141-3158.

Raphael Y, Athey BD, Wang Y, Lee MK, Altschuler RA (1994) F-actin, tubulin and spectrin in the organ of Corti: comparative distribution in different cell types and mammalian species. Hear Res 76:173-187.

Reisinger E, Bresee C, Neef J, Nair R, Reuter K, Bulankina A, Nouvian R, Koch M, Buckers J, Kastrup L, Roux I, Petit C, Hell SW, Brose N, Rhee JS, Kugler S, Brigande JV, Moser T (2011) Probing the functional equivalence of otoferlin and synaptotagmin 1 in exocytosis. J Neurosci 31:4886-4895.

Riazuddin S, Khan SN, Ahmed ZM, Ghosh M, Caution K, Nazli S, Kabra M, Zafar AU, Chen K, Naz S, Antonellis A, Pavan WJ, Green ED, Wilcox ER, Friedman PL, Morell RJ, Friedman TB (2006) Mutations in TRIOBP, which encodes a putative cytoskeletal-organizing protein, are associated with nonsyndromic recessive deafness. Am J Hum Genet 78:137-143.

Ricci AJ, Crawford AC, Fettiplace R (2003) Tonotopic variation in the conductance of the hair cell mechanotransducer channel. Neuron 40:983-990.

Roux I, Safieddine S, Nouvian R, Grati M, Simmler MC, Bahloul A, Perfettini I, Le Gall M, Rostaing P, Hamard G, Triller A, Avan P, Moser T, Petit C (2006) Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. Cell 127:277-289.

Ruel J, Emery S, Nouvian R, Bersot T, Amilhon B, Van Rybroek JM, Rebillard G, Lenoir M, Eybalin M, Delprat B, Sivakumaran TA, Giros B, El Mestikawy S, Moser T, Smith RJ, Lesperance MM, Puel JL (2008) Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice. Am J Hum Genet 83:278-292.

Santarelli R, Rossi R, Scimemi P, Cama E, Valentino ML, La Morgia C, Caporali L, Liguori R, Magnavita V, Monteleone A, Biscaro A, Arslan E, Carelli V (2015) OPA1-related auditory neuropathy: site of lesion and outcome of cochlear implantation. Brain 138:563-576.

Sarzi E, Angebault C, Seveno M, Gueguen N, Chaix B, Bielicki G, Boddaert N, Mausset-Bonnefont AL, Cazevieille C, Rigau V, Renou JP, Wang J, Delettre C, Brabet P, Puel JL, Hamel CP, Reynier P, Lenaers G (2012) The human OPA1delTTAG mutation induces premature age-related systemic neurodegeneration in mouse. Brain 135:3599-3613.

Scheffer DI, Zhang DS, Shen J, Indzhykulian A, Karavitaki KD, Xu YJ, Wang Q, Lin JJ, Chen ZY, Corey DP (2015) XIRP2, an actin-binding protein essential for inner ear hair-cell stereocilia. Cell Rep 10:1811-1818.

Schmitz F, Konigstorfer A, Sudhof TC (2000) RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. Neuron 28:857-872.

Schneider ME, Belyantseva IA, Azevedo RB, Kachar B (2002) Rapid renewal of auditory hair bundles. Nature 418:837-838.

Schoen CJ, Burmeister M, Lesperance MM (2013) Diaphanous homolog 3 (Diap3) overexpression causes progressive hearing loss and inner hair cell defects in a transgenic mouse model of human deafness. PLoS One 8:e56520.

Schoen CJ, Emery SB, Thorne MC, Ammana HR, Sliwerska E, Arnett J, Hortsch M, Hannan F, Burmeister M, Lesperance MM (2010) Increased activity of Diaphanous homolog 3 (DIAPH3)/diaphanous causes hearing defects in humans with auditory neuropathy and in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A 107:13396-13401.

Schrauwen I, Helfmann S, Inagaki A, Predoehl F, Tabatabaiefar MA, Picher MM, Sommen M, Seco CZ, Oostrik J, Kremer H, Dheedene A, Claes C, Fransen E, Chaleshtori MH, Coucke P, Lee A, Moser T, Van Camp G (2012) A mutation in CABP2, expressed in cochlear hair cells, causes autosomal-recessive hearing impairment. Am J Hum Genet 91:636-645.

Schulman-Galambos C, Galambos R (1979) Brain stem evoked response audiometry in newborn hearing screening. Arch Otolaryngol 105:86-90.

Seal RP, Akil O, Yi E, Weber CM, Grant L, Yoo J, Clause A, Kandler K, Noebels JL, Glowatzki E, Lustig LR, Edwards RH (2008) Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. Neuron 57:263-275.

Seaman JW, Jr., Walls SC, Wise SE, Jaeger RG (1994) Caveat emptor: rank transform methods and interaction. Trends Ecol Evol 9:261-263.

Self T, Mahony M, Fleming J, Walsh J, Brown SD, Steel KP (1998) Shaker-1 mutations reveal roles for myosin VIIA in both development and function of cochlear hair cells. Development 125:557-566.

Self T, Sobe T, Copeland NG, Jenkins NA, Avraham KB, Steel KP (1999) Role of myosin VI in the differentiation of cochlear hair cells. Dev Biol 214:331-341.

Senften M, Schwander M, Kazmierczak P, Lillo C, Shin JB, Hasson T, Geleoc GS, Gillespie PG, Williams D, Holt JR, Muller U (2006) Physical and functional interaction between protocadherin 15 and myosin VIIa in mechanosensory hair cells. J Neurosci 26:2060-2071.

Sergeyenko Y, Lall K, Liberman MC, Kujawa SG (2013) Age-related cochlear synaptopathy: an early-onset contributor to auditory functional decline. J Neurosci 33:13686-13694.

Shahin H, Walsh T, Sobe T, Abu Sa'ed J, Abu Rayan A, Lynch ED, Lee MK, Avraham KB, King MC, Kanaan M (2006) Mutations in a novel isoform of TRIOBP that encodes a filamentous-actin binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss. Am J Hum Genet 78:144-152.

Slepecky N, Chamberlain SC (1985) Immunoelectron microscopic and immunofluorescent localization of cytoskeletal and muscle-like contractile proteins in inner ear sensory hair cells. Hear Res 20:245-260.

Slepecky N, Hamernik RP, Henderson D (1980) A re-examination of a hair cell organelle in the cuticular plate region and its possible relation to active processes in the cochlea. Hear Res 2:413-421.

Sobkowicz HM, Slapnick SM, August BK (1995) The kinocilium of auditory hair cells and evidence for its morphogenetic role during the regeneration of stereocilia and cuticular plates. J Neurocytol 24:633-653.

Spencer RF, Shaia WT, Gleason AT, Sismanis A, Shapiro SM (2002) Changes in calcium-binding protein expression in the auditory brainstem nuclei of the jaundiced Gunn rat. Hear Res 171:129-141.

Spoendlin H, Brun JP (1974) The block-surface technique for evaluation of cochlear pathology. Arch Otorhinolaryngol 208:137-145.

Stamataki S, Francis HW, Lehar M, May BJ, Ryugo DK (2006) Synaptic alterations at inner hair cells precede spiral ganglion cell loss in aging C57BL/6J mice. Hear Res 221:104-118.

Starr A, Picton TW, Sininger Y, Hood LJ, Berlin CI (1996) Auditory neuropathy. Brain 119 (Pt 3):741-753.

Starr A, Michalewski HJ, Zeng FG, Fujikawa-Brooks S, Linthicum F, Kim CS, Winnier D, Keats B (2003) Pathology and physiology of auditory neuropathy with a novel mutation in the MPZ gene (Tyr145->Ser). Brain 126:1604-1619.

Starr A, Isaacson B, Michalewski HJ, Zeng FG, Kong YY, Beale P, Paulson GW, Keats BJ, Lesperance MM (2004) A dominantly inherited progressive deafness affecting distal auditory nerve and hair cells. J Assoc Res Otolaryngol 5:411-426.

Steyger PS, Furness DN, Hackney CM, Richardson GP (1989) Tubulin and microtubules in cochlear hair cells: comparative immunocytochemistry and ultrastructure. Hear Res 42:1-16.

Stritt S et al. (2016) A gain-of-function variant in DIAPH1 causes dominant macrothrombocytopenia and hearing loss. Blood 127:2903-2914.

Szarama KB, Gavara N, Petralia RS, Kelley MW, Chadwick RS (2012) Cytoskeletal changes in actin and microtubules underlie the developing surface mechanical properties of sensory and supporting cells in the mouse cochlea. Development 139:2187-2197.

Takasaka T, Shinkawa H, Hashimoto S, Watanuki K, Kawamoto K (1983) High-voltage electron microscopic study of the inner ear. Technique and preliminary results. Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl 101:1-12.

Taylor R, Bullen A, Johnson SL, Grimm-Gunter EM, Rivero F, Marcotti W, Forge A, Daudet N (2015) Absence of plastin 1 causes abnormal maintenance of hair cell stereocilia and a moderate form of hearing loss in mice. Hum Mol Genet 24:37-49.

Tilney LG, Derosier DJ, Mulroy MJ (1980) The organization of actin filaments in the stereocilia of cochlear hair cells. J Cell Biol 86:244-259.

Tilney LG, Tilney MS, DeRosier DJ (1992) Actin filaments, stereocilia, and hair cells: how cells count and measure. Annu Rev Cell Biol 8:257-274.

Tilney LG, Egelman EH, DeRosier DJ, Saunder JC (1983) Actin filaments, stereocilia, and hair cells of the bird cochlea. II. Packing of actin filaments in the stereocilia and in the cuticular plate and what happens to the organization when the stereocilia are bent. J Cell Biol 96:822-834.

Ueyama T, Ninoyu Y, Nishio SY, Miyoshi T, Torii H, Nishimura K, Sugahara K, Sakata H, Thumkeo D, Sakaguchi H, Watanabe N, Usami SI, Saito N, Kitajiri SI (2016) Constitutive activation of DIA1 (DIAPH1) via C-terminal truncation causes human sensorineural hearing loss. EMBO Mol Med.

Valat J, Griguer C, Lehouelleur J, Sans A (1991) Motile responses of isolated guinea pig vestibular hair cells. Neurosci Lett 127:231-236.

Varga R, Avenarius MR, Kelley PM, Keats BJ, Berlin CI, Hood LJ, Morlet TG, Brashears SM, Starr A, Cohn ES, Smith RJ, Kimberling WJ (2006) OTOF mutations revealed by genetic analysis of hearing loss families including a potential temperature sensitive auditory neuropathy allele. J Med Genet 43:576-581.

Verhagen WI, Huygen PL, Gabreels-Festen AA, Engelhart M, van Mierlo PJ, van Engelen BG (2005) Sensorineural hearing impairment in patients with Pmp22 duplication, deletion, and frameshift mutations. Otol Neurotol 26:405-414.

Vranceanu F, Perkins GA, Terada M, Chidavaenzi RL, Ellisman MH, Lysakowski A (2012) Striated organelle, a cytoskeletal structure positioned to modulate hair-cell transduction. Proc Natl Acad Sci U S A 109:4473-4478.

Wallar BJ, Alberts AS (2003) The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. Trends Cell Biol 13:435-446.

Wallar BJ, Deward AD, Resau JH, Alberts AS (2007) RhoB and the mammalian Diaphanous-related formin mDia2 in endosome trafficking. Exp Cell Res 313:560-571.

Wang Q, Gu R, Han D, Yang W (2003) Familial auditory neuropathy. Laryngoscope 113:1623-1629.

Wang QJ, Li QZ, Rao SQ, Lee K, Huang XS, Yang WY, Zhai SQ, Guo WW, Guo YF, Yu N, Zhao YL, Yuan H, Guan J, Leal SM, Han DY, Shen Y (2006) AUNX1, a novel locus responsible for X linked recessive auditory and peripheral neuropathy, maps to Xq23-27.3. J Med Genet 43:e33.

Weil D, Blanchard S, Kaplan J, Guilford P, Gibson F, Walsh J, Mburu P, Varela A, Levilliers J, Weston MD, et al. (1995) Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. Nature 374:60-61.

Wen Y, Eng CH, Schmoranzer J, Cabrera-Poch N, Morris EJ, Chen M, Wallar BJ, Alberts AS, Gundersen GG (2004) EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. Nat Cell Biol 6:820-830.

Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Mustapha M, Salem N, El-Zir E, Loiselet J, Petit C (1999) A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. Nat Genet 21:363-369.

Yu-Wai-Man P et al. (2010) Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations. Brain 133:771-786.

Zenisek D, Davila V, Wan L, Almers W (2003) Imaging calcium entry sites and ribbon structures in two presynaptic cells. J Neurosci 23:2538-2548.

Zhang DS, Piazza V, Perrin BJ, Rzadzinska AK, Poczatek JC, Wang M, Prosser HM, Ervasti JM, Corey DP, Lechene CP (2012) Multi-isotope imaging mass spectrometry reveals slow protein turnover in hair-cell stereocilia. Nature 481:520-524.

Zhao Y, Yamoah EN, Gillespie PG (1996) Regeneration of broken tip links and restoration of mechanical transduction in hair cells. Proc Natl Acad Sci U S A 93:15469-15474.

Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P (2000) Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. Nature 405:149-155.

Zong L et al. (2015) Mutations in apoptosis-inducing factor cause X-linked recessive auditory neuropathy spectrum disorder. J Med Genet 52:523-531.

7. Manuscript

Remodeling of the inner hair cell microtubule meshwork in auditory neuropathy AUNA1

Clément Surel[1*], Marie Guillet[1*], Marc Lenoir[1], Jérôme Bourien[1], Gaston Sendin[1], Willy Joly[1], Benjamin Delprat[1], Marci M. Lesperance[2], Jean-Luc Puel[1] and Régis Nouvian[1,3]

*equal contribution

[1] Inserm U1051- Institute for Neurosciences of Montpellier
University of Montpellier, France

[2] Division of Pediatric Otolaryngology, Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, University of Michigan Health System, Ann Arbor, Michigan USA 48109

Corresponding author: Régis Nouvian
Inserm U1051 - Institute for Neurosciences of Montpellier
80, rue Augustin Fliche - 34295 Montpellier Cedex 5, France
Tel: 00 33 (0)6 43 34 46 88 - Fax: 00 33 (0)4 99 63 60 20
e-mail: regis.nouvian@inserm.fr

Author Contributions: C.S, MG, ML, GS, WJ, JLP and RN Designed Research. C.S, MG, ML, GS Performed research. JB, BJ, MML, JLP and RN Contributed unpublished reagents/ analytic tools. C.S, MG, JB and RN Analyzed data. C.S, MG, ML, JB, GS, WJ, MML, JLP and RN Wrote the paper.

Conflict of Interest: Authors report no conflict of interest.

Funding sources: This work was supported by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-13-JSV1-0009-01 to R.N.). C.S. and W.J. are recipients of the EpiGenMed Labex fellowship. G.S. is a recipient of the Montpellier university postdoctoral fellowship.

Keywords: Cochlea, Deafness, Diaphanous, Diap3, Cuticular Plate

Abstract

Auditory neuropathy 1 (AUNA1) is a form of human deafness resulting from a point mutation in the 5' untranslated region of the *Diaphanous homolog 3* (*DIAPH3*) gene. Notably, the *DIAPH3* mutation leads to the overexpression of the DIAPH3 protein, a formin family member involved in cytoskeleton dynamics. Through study of diap3-overexpressing transgenic (Tg) mice, we examine in further detail the anatomical, functional and molecular mechanisms underlying AUNA1. We identify diap3 as a component of the stereociliary bundle in wild-type mice. In the diap3-overexpressing Tg mice, which show a progressive threshold shift associated with a defect in inner hair cells (IHCs), the neurotransmitter release and potassium conductances are not affected. Strikingly, the overexpression of diap3 results in a selective and early-onset alteration of the IHC cuticular plate. Molecular dissection of the apical components revealed that the microtubule meshwork first undergoes aberrant targeting into the cuticular plate of Tg IHCs, followed by collapse of the stereociliary bundle, with eventual loss of the IHC capacity to transmit incoming auditory stimuli.

Significance statement

The mutation in the Diaphanous homolog 3 gene, which leads to the diap3 protein overexpression, underlies the human deafness called auditory neuropathy 1 (AUNA1). While diap3 is known to regulate the cytoskeleton, the signaling cascade operating in AUNA1 is still unclear. Using transgenic mice, which overexpress diap3 and thus replicate AUNA1, we show that microtubules accumulate at the apical pole of auditory sensory cells, the inner hair cells. The microtubule network remodeling is followed by the anatomical alteration of the mechano-transduction apparatus, which could explain the failure to transduce acoustic stimuli into neural message. Altogether, this study deciphers the mechanism of AUNA1 deafness, the first step to developing a treatment for patients affected with this form of deafness.

Introduction

Auditory neuropathy is a form of human deafness in which the auditory brainstem response (ABR) is absent or altered, while outer hair cells (OHCs), which amplify the sound stimulation in the cochlea, are still preserved (Starr et al., 1996; Rance and Starr, 2015). A variety of etiologies may result in this disorder, including defects in cochlear inner hair cells (IHCs) that transduce sound stimulation into neurotransmitter release, and defects or absence of the auditory afferent fibers that convey the neural message to the cochlear nuclei. Auditory neuropathy may be a systemic condition involving neuropathies of multiple cranial and peripheral nerves, while nonsyndromic auditory neuropathy is limited to the auditory nerve. At this time, most cases of nonsyndromic auditory neuropathy arise from synaptic transfer failure (Moser and Starr, 2016).

A mutation in the *Diaphanous homolog 3* (*DIAPH3*) gene is responsible for autosomal dominant non-syndromic auditory neuropathy 1 (AUNA1; Greene et al., 2001; Kim et al., 2004; Starr et al., 2004). DIAPH3 belongs to the formin related family, known to promote the nucleation and elongation of actin filaments and to stabilize microtubules (Wallar and Alberts, 2003; Higgs, 2005; Kovar, 2006). Strikingly, the point mutation in the 5' untranslated region of the human *DIAPH3* leads to the overexpression of the DIAPH3 protein (Schoen et al., 2010). Accordingly, a drosophila model that expresses a constitutively active *diaphanous* protein in the auditory organ exhibits an impaired response to sound (Schoen et al., 2010). Transgenic (Tg) mice overexpressing *diap3* (the murine ortholog of *DIAPH3*) have been an useful tool to dissect the AUNA1 mechanism (Schoen et al., 2013), demonstrating that the overexpression of diap3 in Tg mice recapitulates the human AUNA1 phenotype, i.e., a delayed-onset and progressive hearing loss leaving OHCs unaffected (Schoen et al., 2013). In addition, IHCs of Tg mice show fusion of the stereociliar bundle, implicated as the primary cause of the deafness (Schoen et al., 2013). However, the molecular mechanisms responsible for these morphological changes are still unknown.

Here, we examine in further detail the anatomical, functional and molecular mechanisms underlying AUNA1, confirming that the diap3-overexpressing Tg mice mimic the human AUNA1 phenotype. Molecular dissection of the apical side revealed that the cytoskeleton meshwork undergoes an aberrant remodeling into the cuticular plate of Tg IHCs at early stages. Strikingly, the overexpression of diap3 leads to an accumulation of microtubules within

the IHC cuticular plate. Ultimately, the invasion of microtubules at the apical side of IHCs may interfere with the capability of these sensory cells to transduce incoming acoustic cues.

Material and methods

Experiments were carried out in accordance with the animal welfare guidelines 2010/63/EC of the European Communities Council Directive regarding the care and use of animals for experimental procedures. Animals were housed in facilities accredited by the French "Ministère de l'Agriculture et de la Forêt" (Agreement C-34-172-36) and the experimental protocol was approved (Authorization CEEA-LR- 12111) by the Animal Ethics Committee of Languedoc-Roussillon (France).

Animals. The *diap3*-overexpressing transgenic mice have been previously described (Schoen et al., 2013). In brief, these animals harbor a random insertion of the transgene, composed of the mouse *diap3* gene driven by CMV promoter, in the genomic DNA (Schoen et al., 2013). Two lines of mice were obtained, differing in the number of inserted copies of the transgene: 8 for line 771 and 6 for line 924 (Schoen et al., 2013). Mice were bred in-house and maintained on a FVB/NJ genetic background. Line 924 (FVB-Tg(CAG-Diap3)924/Lesp/J is available from Jackson Laboratories (JAX Stock No. 017881). Line 771 (FVB/N-Tg(CAG-Diap3)771Lesp/Mmmh) is available from the Mutant Mouse Research & Resource Center (www.mmrrc.org).

Plasmids. Plasmids used for *diap1-GFP* and *diap3-GFP* expression in HEK293 cells were pReceiver-M03-Diap1 (Genecopoeia, Rockville, MD, USA) and pEFmEGFP-mDia2 (Addgene, Cambridge, MA, USA), respectively (GenBank accession number: diap1: BC070412.1; diap3: AF094519.1). *Diap2* coding sequence was subcloned from the donor plasmid pCMV6-Ac-GFP-diap2 (Origene, Rockville, MD, USA) into the receiver plasmid pEGFP-C3 (Takara, Kyoto, Japan), using In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara, Kyoto, Japan; National Center for Biotechnology Information Reference Sequence for *diap2*: NM_172493.2). *Diap2* coding sequence was amplified from the donor plasmid using the primers diap2-PEGFP-3-F (5'-GTACTCAGATCTCGAGATGGAGGAGCTCGGGG-3') and diap2-PEGFP-2-R (5'-TAGATCCGGTGGATCCTTGGATGACATGGCTCCATTG-3') (Eurogentec, Liege, Belgium). The receiver plasmid was digested with XhoI and BamHI restriction enzymes (Promega, Madison, WI, USA). Sub-cloning was performed following the instructions from the manufacturer (Takara). Sequencing of the obtained plasmids for verification was performed by Genewiz (South Plainfield, NJ, USA).

Cell culture. Human embryo kidney 293 cell line (HEK293) was maintained in DMEM/F12 culture medium (life technologies, Carlsbad, CA, USA) with 10% of Fetal Bovine Serum (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at 37°C in a humidified atmosphere under 5% CO_2.

Cell transfection and protein extraction. Cells were grown to 60%-80% confluence and transfected with plasmids using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instruction. 48 hours after the transfection, HEK293 cells were lysed with a lysis buffer (pH: 7.6) containing in mM: 20 Tris-HCl, 100 NaCl, 5 EDTA, 1% Triton X-100, 1 Phenylmethylsulfonyl fluoride and cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail 1X (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Samples were placed on an orbital shaker 2 hours at 4°C then centrifuged during 20 min at 13,200 rpm and at 4°C. Supernatants were collected and protein concentration was determined using Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

Western blot. Each sample was prepared by mixing 20 µg of protein with loading buffer 1X (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and 0.05% β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Samples were heated 5 min at 95°C to allow denaturation of the proteins by β-mercaptoethanol. Samples were dropped on 10% polycrylamide gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After migration, proteins were transferred on membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were incubated 1 hour in a blocking buffer containing: Tris-buffered saline (TBS) 1X, 0.001% Tween-20 and 3% milk. After blocking, primary antibodies were added into the blocking buffer and membranes were incubated overnight at 4°C. The used primary antibodies and their respective dilution were GFP 1:10,000 (Abcam, Cambridge, England, UK), Diap3 1:20,000 (Eurogentec, Liege, Belgium) and α-Tubulin 1:5,000 (Abcam, Cambridge, England, UK). Membranes were washed 5x5 min with the washing buffer containing: TBS and 0.001% Tween-20. They were incubated 2 hours in the blocking buffer containing secondary antibodies conjugated to horseradish peroxydase. They were washed 5x5 min with the washing buffer. After the last washing, membranes were incubated 1-5 min in ECL solution (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and staining were revealed using ChemiDoc™ MP System instrument (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Genotyping. Transgenic mice were identified by Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis of genomic DNA using FastStart PCR Master Mix (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Tail or toe biopsies were digested overnight at 55°C in 300 µl of lysis buffer (containing in mM: 100 Tris-HCL pH 8.5; 5 EDTA; 0.2% SDS; 200 NaCl; pH : 8.5) with 100µg/ml of proteinase K (Promega, Madison, WI, USA). Samples were centrifuged 5 min at 10 000g and supernatants were collected. DNA was precipitated by addition of 500 µl of isopropanol. Samples were centrifuged 10 min at 10 000 g and supernatants were discarded. DNA was washed with 500 µl of EtOH 70% and centrifuged 5 min at 10 000 g. After evaporation of the EtOH, DNA was suspended in 100 µl of water. The PCR was conducted with the following thermal cycle program: 1 cycle of 95°C for 10 min; 40 cycles of 94°C for 40 s, 62°C for 30 s, 72°C for 1 min; final elongation step at 72°C for 7 min. A part of the exogenous promoter, unique to the transgene and therefore not present in the wild-type mouse genomic DNA, was detected using the 5'-TGG TTA TTG TGC TGT CTC ATC A-3' forward primer and the 5'-TTG TCC AGC ATA TCA TCT GTC A- 3' reverse primer (Eurogentec, Liege, Belgium). Thus, a 300-bp amplicon was only obtained from DNA of transgenic mice, which was visible on a 2% agarose gel electrophoresis of PCR product.

***In vivo* recordings.** Mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of a mixture of Zoletil 50 (40mg/kg) and Rompun 2% (3mg/kg). The rectal temperature was measured with a thermistor probe, and maintained at 37.1°C ± 1°C, using a heated underblanket. (Homeothermic Blanket Systems, Harvard Apparatus). Heart rate was monitored via EKG electrodes.

Auditory brainstem response and distortion product otoacoustic emission recordings. For auditory brainstem response (ABR), the acoustical stimuli consisted of 9-ms tone bursts, with a plateau and a 1-ms rise/fall time, delivered at a rate of 11/s with alternate polarity by a JBL 2426H loudspeaker in a calibrated free field. Stimuli were presented to the left ear by varying intensities from 100 dB SPL to 0 dB SPL, in 5 dB step. Stimuli were generated and data acquired using MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA) and LabView (National Instruments, Austin, TX, USA) software. The difference potential between vertex and mastoid intradermal needles was amplified (2500 times, VIP-20 amplifier), sampled (at a rate of 50

kHz), filtered (bandwidth of 0.3-3 kHz) and averaged (100 to 700 times). Data were displayed using LabView software and stored on a computer (Dell T7400). ABR thresholds were defined as the lowest sound intensity, which elicits a clearly distinguishable response. For distortion distortion product otoacoustic emission (DPOAE) recordings, an ER-10C S/N 2528 probe (Etymotic Research), consisting of two emitters and one microphone, was inserted in the left external auditory canal. Stimuli were two equilevel (65 dB SPL) primary tones f1 and f2 with a constant f2/f1 ratio of 1.2. The distortion 2f1-f2 was extracted from the ear canal sound pressure and processed by HearID auditory diagnostic system (Mimosa Acoustic) on a computer (Hewlett Packard). The probe was self-calibrated for the two stimulating tones before each recording. f1 and f2 were presented simultaneously, sweeping f2 from 20 kHz to 2 kHz by quarter octave steps. For each frequency, the distortion product 2f1-f2 and the neighboring noise amplitude levels were measured and expressed as a function of f2.

Electrocochleography. A retroauricular incision of the skin was performed on anesthetized mice and the left tympanic bulla was opened. Cochlear potentials were recorded with a silver positive electrode placed on the round window membrane. The acoustical stimuli were identical to those used to elicit ABRs except for the alternate polarity. Gross cochlear potentials were amplified (2500 times, VIP-20 amplifier), sampled (at a rate of 50 kHz), filtered (bandwidth of 0.001-20 kHz), averaged (50 to 300 times), displayed with LabView software and stored on a computer (Dell T7400). The signal was then digitally filtered using MATLAB software with a low-pass filter (cut-off frequency 3.5 kHz) to measure the compound action potential (CAP) and the summating potential (SP), and with a band-pass filter centered on the frequency of stimulation with a 4 kHz span to measure the cochlear microphonic (CM).

Patch-clamp recordings. After cervical dislocation of mice (postnatal day 13 [P13] to 19 [P19]), IHCs of the apical coil of freshly dissected organs of Corti were patch-clamped at their basolateral face at room temperature in tight whole-cell or perforated-patch configurations (Nouvian, 2007). The dissection solution contained the following in mM: 5.36 KCl, 141.7 NaCl, 1 $MgCl_2$-$6H_2O$, 0.5 $MgSO_4$-$7H_2O$, 10 HEPES and 10 D-glucose. For recording of K^+ currents, the extracellular solution contained the following in mM: 5.8 KCl, 144 NaCl, 0.9 $MgCl_2$-$6H_2O$, 1.3 $CaCl_2$, 10 HEPES, 10 D-Glucose. The pipette solution for recording of K^+ currents contained the following in mM: 135 KCl, 1 $MgCl_2$-$6H_2O$, 10 HEPES, 2 Mg-ATP,

0.3 Na-GTP, 5 EGTA. For Ca^{2+} current and capacitance measurement recordings, the extracellular solution contained the following in mM: 2.8 KCl, 105 NaCl, 1 $MgCl_2$-$6H_2O$, 2 $CaCl_2$, 10 HEPES, 35 TEA-Cl, 1 CsCl, 10 D-Glucose. The pipette solution for whole-cell recordings of Ca^{2+} currents contained the following in mM: 135 Cs-glutamic acid, TEA-Cl, 10 4-AP, 1 $MgCl_2$-$6H_2O$, 10 HEPES, 2 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP. The pipette solution for perforated patch recordings contained the following in mM: 135 KCl, 10 HEPES, 1 $MgCl_2$ and 400 μg/ml amphotericin B. Solutions were adjusted to pH 7.3 and had osmolarities between 290 and 310 mOsm/kg H_2O. All chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) with the exception of amphotericin B (Calbiochem, La Jolla, USA). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (Kwik Fil, WPI, Worcester, MA, USA) with a two-step vertical puller PIP 6 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) and coated with silicone elastomer (Sylgard).

K^+ current recordings and resting membrane potentials. Currents were low-pass filtered at 5 kHz and sampled at 50 kHz. Series resistance (Rs) was compensated on-line (80%; t = 10 μs), and all voltages were corrected for the voltage drop across the uncompensated series resistance (7.25 ± 0.31 MOhm for WT mice, 9.12 ± 0.99 MOhm for Tg mice) and for liquid junction potentials (-4 mV) measured between intra- and extracellular solutions. Except for the deactivated current recordings (KCNQ conductances), all currents were leak-corrected using P/n protocol (10 leak pulses with amplitudes of 20% of the original pulse from a holding potential of -104 mV).

Ca^{2+} current recordings. Currents were low-pass filtered at 5 kHz and sampled at 10 kHz for exocytic cell membrane capacitance change (ΔCm) and at 40 kHz for Ca^{2+} current recordings. Ca^{2+} current was isolated using P/n protocols (10 leak pulses with amplitudes of 20% of the original pulse from a holding potential of -117 mV). Ca^{2+} current integrals were calculated from the total depolarization-evoked inward current, including Ca^{2+} tail currents after P/n leak subtraction (i.e. from the start of the depolarization step to 1.5 ms after the end of the depolarization step). Cells that displayed a membrane current exceeding -50 pA at -87mV were discarded from the analysis. No Rs compensation was applied, but recordings with Rs > 30 MOhm and Rs > 15 MOhm for perforated and whole-cell patch-clamp experiments, respectively, were discarded from the analysis. All voltages were corrected for liquid junction potentials calculated between pipette and bath (-17 mV).

Capacitance measurement recordings. Cell membrane capacitance (Cm) was measured using the Lindau–Neher technique (Lindau & Neher, 1988), implemented in the software-lockin module of Patchmaster (HEKA Elektronik) combined with compensation of pipette and resting cell capacitances by the EPC-10 (HEKA Elektronik) compensation circuitries. A 1 kHz, a 70 mV peak-to-peak sinusoid was applied about the holding potential of -87 mV. ΔCm was estimated as the difference of the mean Cm over 400 ms after the end of the depolarization (the initial 250 ms was skipped) and the mean prepulse capacitance (400 ms). Mean ΔCm estimates present grand averages calculated from the mean estimates of individual IHCs.

Immunohistochemistry and confocal microscopy. Immunohistochemistry was performed on whole-mount preparations of organs of Corti. The mice were decapitated under deep anesthesia using 50 mg/kg pentobarbital and their cochleas were removed from the temporal bone and dissected in the patch-clamp dissecting solution. The apical turns of the cochleas were then fixed 15 min in 4% paraformaldehyde diluted in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.3, 4°C); afterwards, they were immune-histochemically processed as a whole-mount. The tissues were rinsed 3x10 min in PBS (containing in mM: 130 NaCl, 2.68 KCl, 10 Na_2HPO_4, 1.47 KH_2PO_4), then preincubated 30 min in blocking solution (10% donkey serum, 0.3% Triton), then incubated overnight at 4°C in the incubation solution (1% donkey serum, 0.1% Triton) with primary antibodies or antisera. The primary antibodies used and their respective dilution were CtBP2 1:1000 (BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA; RRID: AB_399431), GluA2/3 1:50 (RRID: AB_90710) and spectrin 1:400 (Millipore, Billerica, MA, USA; RRID AB_11214057), α1 tubulin 1:500 (RRID: AB_521686), β1 tubulin 1:10 and β2 tubulin 1:500 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA; RRID: AB_792489), β4 tubulin 1:200 (RRID:AB_297919), acetylated α tubulin 1:500 and detyrosinated α tubulin 1:500 (Abcam, Cambridge, England, UK; RRID:AB_869990). The diap3 antiserum was produced by Eurogentec (Liege, Belgium). It was raised in guinea pig against a specific motif of mouse diap3 (amino acids 94-105: LSSETMENNPKA). The dilution used was 1:200. Tissues were then rinsed 3x10 min in wash buffer (containing in mM: 15.8 Na_2HPO_4, 2.9 NaH_2PO_4, 0.3% Triton X-100, 450 NaCl) and incubated for 2 hours in the incubation solution with fluorescently labeled secondary antibodies, rhodamin-phalloidin (Molecular probes, Eugene, OR, USA) and/or Hoechst dye (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). They were finally rinsed 3x10

min in wash buffer and mounted in Prolong Gold Antifade Reagent (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Tissues were examined with the Zeiss LSM780 (Zeiss, Oberkochen, Germany) or Leica SP8-UV (Leica, Wetzlar, Germany) confocal microscopes of the Montpellier RIO Imaging facility (Montpellier, France). Image stacks were then processed with ImageJ software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). For fluorescence analysis and synapse counting, image stacks were processed with MATLAB software. The juxtaposed spots of the presynaptic ribbon component RIBEYE and postsynaptic glutamate receptors subunits GluA2/3 allowed the quantification of the ribbon-containing synapses per IHC. For each condition (antibody, age, genotype), at least 3 cochleas were examined.

Electron microscopy. Scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy were done for morphologic evaluation of the cochlear hair cells. For both techniques, the animals were decapitated under deep anaesthesia (pentobarbital, 50 mg/kg), their cochleas were removed from the temporal bone, perfused with a solution of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3–7.4), and immersed in the same fixative for 1 h at room temperature. For SEM, the bony capsule of the cochlea was dissected out, and the stria vascularis as well as the tectorial and Reissner's membranes were removed. After being rinsed in the phosphate buffer, the samples were dehydrated in a graded series of ethanol (30–100%), critical point dried in CO_2, coated with gold–palladium, and observed under a Hitachi S4000 microscope. Examinations were made all along the cochlear spiral (around 6 mm long) from the apex to the basal end. For each condition (age and genotype), at least 3 cochleas were processed and examined using SEM. For TEM, the cochleas were post-fixed in a 2% aqueous solution of osmium tetroxide for 1 h, rinsed in phosphate buffer, dehydrated in a graded series of ethanol (30–100%), and embedded in Epon resin. Ultra-thin radial sections of the organ of Corti were cut in the 16 kHz region of the cochlea, mounted on formvar-coated grids, stained with uranyl acetate and lead citrate, and observed using a Hitachi 7100 microscope. For TEM, we examined one or two cochleas at each age in the Tg 924 line.

Data analysis. Data were analyzed using MATLAB and Igor Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) softwares. All these data are expressed as means ± standard error of mean (s.e.m.) and were compared by Student t-test and Wilcoxon test.

Results

Diap3-overexpressing mutant mice replicate AUNA1. We examined the auditory system of two lines of Tg mice overexpressing the diap3 protein (Tg 771 and Tg 924). In response to incoming sound stimulation, both Tg lines showed a progressive reduction in the auditory brainstem response (ABR) amplitude (Fig. 1A, D). In addition, both Tg lines showed a progressive threshold shift (Fig. 1B, E). Hearing impairment progressed more rapidly in the Tg 771 mice as compared to the Tg 924 mice. Despite a slight reduction in the distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) amplitude in Tg 771 mice, both lines showed robust DPOAEs, indicating that OHC activity was essentially preserved (Fig. 1C, F). Altogether, the two Tg lines replicate the hallmarks of AUNA1 deafness, i.e, progressive hearing loss together with functional cochlear amplification.

Altered transduction in IHCs of diap3-overexpressing mutant mice. To better understand the mechanisms underlying AUNA1, we measured the activity of the sensory hair cells *in vivo* using electrocochleography. Compound action potential was strongly diminished in both Tg lines (Fig. 2A, C). In addition, we found a drastic reduction in the summating potential amplitude (Fig. 2A, D). Consistent with robust DPOAEs in the Tg mice, both wild-type (WT) and Tg lines showed comparable strong cochlear microphonic responses (Fig. 2B, E). These results illustrate a selective alteration of IHC function in the Tg mice. Moreover, the reversal behavior of the summating potential, i.e., negative amplitude in the diap3 overexpressing mice, is reminiscent of changes in the ionic conductances of IHCs (Bobbin et al., 1990; 1991) or in the resting position of the stereocilia displacement-response curve (Corey and Hudspeth, 1983; Farris et al., 2006; Johnson et al., 2011).

Normal synaptic vesicle recycling in diap3-overexpressing mutant mice. To determine whether the stimulation-secretion coupling is affected by the diap3 overexpression, calcium-triggered exocytosis was probed using patch-clamp recordings (Fuchs et al., 2003). Because the Tg 771 line already showed a threshold shift occurring immediately after the onset of hearing (threshold: 16.1 ± 1.4 dB SPL and 28.3± 1.7 dB SPL in P19-P22 WT and Tg 771, respectively, in response to 10 kHz tone burst. WT, n=9; Tg 771, n=3. $p<0.05$; Wilcoxon test), membrane capacitance, reflecting synaptic vesicle exocytosis, was measured in IHC from 2 to

4 weeks of age in this Tg line (Fig. 3). No difference was observed in the amplitude or in the voltage activation of the calcium current between WT and Tg 771 mice (Fig. 3A). In addition, membrane capacitance jumps evoked by calcium influx of different durations were comparable between WT and Tg 771 mice (Fig. 3B-C). Furthermore, the number of ribbon synapses was not altered in one month-old Tg 771 mice (Fig. 3D-G). Taken together, these data exclude a primary defect at the IHC ribbon synapse in AUNA1.

Potassium currents are not affected in diap3-overexpressing mutant mice. Because IHC potassium conductances contribute to the receptor potential (Corey and Hudspeth, 1983), we then recorded the different potassium currents in IHC. In response to depolarizing step, IHC elicit fast and slow outward potassium currents, carried by BK and delayed-rectifier channels, respectively (Kros and Crawford, 1990; Marcotti et al., 2003; Oliver et al., 2003). No difference in the amplitude or voltage activation of K^+ currents was measured between IHCs of WT and Tg 771 mice (Fig. 4A-C). In addition, IHCs from Tg 771 mice expressed a deactivating potassium current, which is carried by the KCNQ4 potassium channel and sets the resting membrane potential (Fig. 4D-E; Marcotti et al., 2003; Oliver et al., 2003). Accordingly, the resting membrane potential in IHCs of Tg 771 mice lies in the same voltage range as IHCs of WT mice (Fig. 4F). Therefore, a change in potassium conductance cannot account for the defective receptor potential in AUNA1 deafness.

Distortion of the IHC cuticular plate is the primary defect in Tg mice. As the lack of receptor potential can be explained by a damage of the mechano-transducer apparatus (Corey and Hudspeth, 1983; Farris et al., 2006), the morphology of the hair cell apical pole was assessed using electron microscopy. In WT mice, stereocilia were nicely organized and anchored into the cuticular plate, which shows a normal appearance (Fig. 5A, E, F, J). As early as age 4 months, the WT IHC cuticular plate shows a little knob (Fig. 5B, M). In contrast, the diap3-overexpressing Tg mice showed a severe alteration at the IHC apical side (Fig. 5C-D, G-I, K, N). In both Tg lines, the cuticular plates of IHCs are drastically swollen all along the cochlea (Fig. 5C-D, G-I). Using TEM, the cuticular plate seems to be pushed toward the IHC periphery opposite to the stereociliary bundle leading to its accumulation at the upper side of the cell (Fig. 5K). The displacement of the cuticular plate could be also associated with disarrayed or fused stereocilia (Fig. 5K). Integration of fused stereocilia into the cell cytoplasm was also observed (Fig. 5N). Interestingly, the cuticular plate distortion started promptly after

the onset of hearing, while changes in the stereocilia organization progressively increased over the lifespan of the mice (Fig. 6A-B). In contrast, OHCs from diap3-overexpressing mice retained a normal morphology (Fig. 5C-D, G-H, I, L-O), although a few of them harbored a distorted apical pole (abnormal cuticular plate and stereociliary bundle) or were missing (Fig. 5G-I).

To differentiate between the IHC cuticular plate swelling and the distorted stereocilia as the cause of the hearing loss, we correlated the morphological features to the ABR at different frequencies and ages (Fig. 6C). Plots of anatomical defect scores against the ABR amplitude demonstrated that hearing loss was independent of the cuticular plate distortion (Fig. 6C, *top*) but was highly correlated with fused stereocilia (Fig. 6C, *bottom*). Of note, the number of IHCs harboring a distorted cuticular plate in the 4-month-old WT mice is likely to be overestimated, since our 2D SEM screen could not discriminate the cuticular plate lump in the 4-month-old WT mice from the swelling in the diap3-overexpressing mice at this age. Nevertheless, these results suggest that i) the IHC cuticular plate abnormalities precede the defects of the stereociliary bundle, and that ii) hearing loss ultimately develops due to the disorganization of stereocilia, which most likely impedes the activity of the mechanotransducer channel.

Molecular correlates of cuticular plate remodeling. The morphological distortion of the cuticular plate was then examined at the molecular level. Phalloidin-rhodamine and spectrin immunostainings indicate a severe alteration in the shape of the cuticular plate. While the F-actin as well as spectrin networks appear homogenously distributed in the cuticular plate of WT IHCs, they tend to concentrate at the border of IHCs from both Tg lines, leaving F-actin- and spectrin-free spots in the middle of the cuticular plate (Fig. 7). In contrast, the F-actin and spectrin distribution were not affected in the cuticular plate of OHCs (data not shown). Thus, the drastic remodeling of the cuticular plate molecular components may account for the anatomical alteration observed in electron microscopy.

Aberrant microtubule meshwork distribution in Tg mice. Next, we sought to decipher the mechanism governing the cuticular plate defect in Tg IHCs. Because of the displacement of the cuticular plate, we reasoned that molecular scaffolding proteins interacting with the cuticular plate might be mis-targeted or disrupted. In this framework, microtubules

are potential candidates of interest, as they are known to surround the cuticular plate (Steyger et al., 1989; Furness et al., 1990; Jensen-Smith et al., 2003) and to be downstream targets of the diaphanous family members (Ishizaki et al., 2001; Palazzo et al., 2001; Wen et al., 2004; Bartolini et al., 2008). In WT IHCs, β2-tubulin subunit immunostainings revealed a ring-like distribution of microtubules around the cuticular plate (Fig. 8A-A''). In the Tg 771 and Tg 924 lines, microtubules were found inside the cuticular plate center (Fig. 8B, C). α1-, β1-, and β4-tubulin subunits showed a similar pattern of distribution, i.e, inside the IHC cuticular plate in the diap3-overexpressing mice (data not shown). Close examination showed that microtubules preferentially populated the F-actin-free spot within the cuticular plate. At one-month, Tg 771 IHCs already show a large immunolabeling of microtubules within the cuticular plate center, while Tg 924 IHCs display a more progressive distribution of microtubules (Fig. 8B and C). At later stages, the immunostaining intensity of microtubules ring tended to be reduced in the Tg mice, suggesting a loss of the tubulin subunits that surround the cuticular plate (Fig. 8B and C). The strong overlap between the immunolabelings with antibodies against the α1 and its acetylated form suggests that the aberrant microtubules within the cuticular plate were stable (Fig. 9). The distribution of microtubules was not changed in OHCs (data not shown). These results suggest that in both Tg mice, aberrant distribution of microtubules may exert mechanical constraints against the cuticular plate and thus be responsible for the primary defect in IHCs.

Early onset of microtubule meshwork remodeling. If the microtubule rearrangement is responsible to some extent for the cuticular plate distortion, which is observed right after the onset of hearing, we should then expect an early-onset of abnormal distribution of the microtubules within the cuticular plate. Before the onset of hearing, tubulin immunostaining was confined to the kinocilium area, but no ring-like distribution was conspicuously observed at this stage (Fig. 10A-C). After the onset of hearing, microtubules started to localize around the cuticular plate in the WT mice (Fig. 10 D, G). In Tg 771 and Tg 924 mice at P15 and P21, respectively, we also observed isolated microtubules at the cuticular plate center, below the stereociliary bundle (Fig. 10E-F, H-I). At later stages, microtubules were also found invading the stereociliary bundles. Taken together, these results suggest that microtubule meshwork remodeling occurs at early stages, invading the cuticular plate center, and coincides with the morphological swelling of the cuticular plate.

Diap3 accumulates at the IHC cuticular plate in Tg mice. The massive change in the microtubule distribution may be due to a preferential targeting of diap3 at the apical side of hair cells. To probe this hypothesis, we generated a specific antibody against diap3 (Fig. 11A-B). Using immunohistochemistry, we observed a strong labeling of the stereocilia in both WT IHCs and OHCs, as well as immunostaining of diap3 in the IHC cuticular plate (Fig. 11C-D). In the Tg mouse lines, diap3 was located in the IHC cuticular plate and in the stereocilia overlapping the actin distribution (Fig. 11F-H). However, we did not find expression of diap3 in the cuticular plate of Tg OHCs (Fig. 11E-G). These data suggest that diap3 is a component of the stereociliary bundle in both IHC and OHC and accumulates preferentially at the apical part of IHCs in the Tg lines.

Discussion

We showed that the overexpression of diap3 in mouse mimics the auditory neuropathy 1 (AUNA1), i.e., the loss of the IHC transduction process without affecting OHC amplification. Neurotransmitter release and potassium currents in IHCs were not altered in the diap3-overexpressing mice. However, we distinguished two different steps in the mutant mice: the distortion of the IHC cuticular plate followed by the loss of stereociliary bundle integrity. The aberrant localization of microtubules at the center of the cuticular plate makes the remodeling of the microtubule network an attractive mechanism accounting for the cuticular plate alteration and the AUNA1 deafness.

Microtubule meshwork remodeling in diap3-overexpressing mutant mouse

Diap3 belongs to the formin family, which is known to nucleate and elongate actin filaments and to stabilize microtubules (Ishizaki et al., 2001; Palazzo et al., 2001; Pruyne et al., 2002; Wen et al., 2004; Bartolini et al., 2008). In the WT mouse, our results show that diap3 is preferentially expressed in the stereociliary bundle of both hair cells and is also found in the cuticular plate of IHCs. Because of the large abundance of actin at the hair cell apical side (Flock and Cheung, 1977; Slepecky and Chamberlain, 1985; Furness et al., 2005), it is tempting to consider diap3 as an integral component of the transduction apparatus, with a key role in actin turnover (Schneider et al., 2002; Zhang et al., 2012; Drummond et al., 2015). Consistent with the diap3 localization, a proteomic study has recently identified diap3 in the mouse vestibular hair cell stereociliary bundle (Krey et al., 2015).

In the diap3-overexpressing Tg mice, diap3 is properly distributed along the hair cell stereociliary bundle and, in addition, co-localizes with actin at the IHC cuticular plate. Thus, the abundant expression of diap3 results in its accumulation at the cuticular plate, which may in turn lead to a larger amount of actin (Ishizaki et al., 2001; Pruyne et al., 2002). In this scenario, the excess actin would expand the cuticular plate and lead to a swollen appearance under electron microscopy. Because of the dense and packed structure of the cuticular plate, the remodeling of the actin network would drag together the other components of the cuticular plate, such as spectrin (Drenckhahn et al., 1991; Furness et al., 2008; Vranceanu et al., 2012). However, under this hypothesis, the increase in actin volume would be homogenous within the cuticular plate of the hair cells. In contrast, the cuticular plate shows actin- and spectrin-

free zones, below the stereociliary bundle, which increased in size over time. We found out that microtubules populate the center of the IHCs cuticular plate, i. e., in the actin-free area, of the diap3-overexpressing Tg mice. Thus, the accumulation of diap3 at the cuticular plate may stabilize microtubules at an aberrant place. The excess of microtubules may in turn apply a mechanical force against the cuticular plate, and then displace the cuticular plate toward the periphery of IHCs. The distribution of microtubules within the cuticular plate center, i.e. in the actin-free zones, could be explained by the invasion of the pool of microtubules that surrounds the cuticular plate. However, we did not observe continuous extensions of microtubules from the IHC periphery to the center. Rather, the isolated zones of microtubules after the onset of hearing suggest a *de novo* stabilization of microtubules at the center of the cuticular plate. Interestingly, a gain-of-function variant in *DIAPH1* gene, responsible for macrothrombocytopenia and hearing loss, increases actin polymerization and stabilizes microtubules (Ercan-Sencicek et al., 2015). It is therefore tempting to propose a similar scenario in this form of hearing impairment, i.e., an alteration of the apical pole of the hair cells, but the precise mechanism will require further examination using a knock-in mouse model.

Diap3-over expression alters IHC mechanotransduction

Up to now, defective transmitter release is the most prevalent mechanism to cause human auditory neuropathies (Rance and Starr, 2015). However, synaptic recycling and the number of ribbon synapses were not affected in the diap3 overexpressing mutants, which excludes the loss of the ribbon synapses as a primary cause of AUNA1 deafness, as previously described (Schoen et al., 2013). In contrast, the major abnormality lies at the IHC apical side, with a distortion of the cuticular plate followed by the fusion of the stereociliary bundle. While such abnormalities would most probably impair the activity of the mechanotransducer channel (Beurg et al., 2009), further experiments are needed to confirm whether the loss of the cuticular plate integrity affects the operating range of the mechanotranducer current (Fettiplace and Kim, 2014). However, the correlation between the degree of hearing loss to the anatomical features argues that the hearing impairment does not result from distortion of the cuticular plate but rather from the fusion of stereocilia. How can these two events be related to each other? Because the rootlets emanating from the stereocilia are embedded within the cuticular plate (DeRosier and Tilney, 1989; Furness et al., 2008; Vranceanu et al., 2012), loss of the anchoring structure might impede the stability of the stereocilia and lead to their collapse (Liberman, 1987; Kitajiri et al., 2010). Another cause of the severed stereocilia can be

due to the dense microtubule matrix at the base of the stereocilia, which could interfere with key components of trafficking and delivery toward the stereocilia (Schneider et al., 2002; Zhang et al., 2012; Drummond et al., 2015).

IHC cuticular plate specific alteration

Although diap3 is expressed in both OHC and IHC, only IHCs are affected. This can be explained by the lack of diap3 localization within the OHC cuticular plate, leading to spatial segregation of diap3 and the microtubule network in OHC. The discrepancy in diap3 distribution between hair cells might be due to a different rate of protein turnover. Indeed, the strong diap3 mRNA overexpression in the transgenic mice does not yield to an ubiquitous and massive distribution of diap3, suggesting a fine-tuning regulation at the protein level. The ubiquitination process may be more efficient in OHCs than in IHCs. In this hypothesis, OHCs would easily eliminate any excess of diap3 localized within the cuticular plate in contrast to IHCs (DeWard and Alberts, 2009). Alternatively, the specific IHC alteration might be due to the preferential expression in IHCs of a diap3 activator (a Rho-GTPase family member) or effector (a cytoskeleton binding protein) (Evangelista et al., 2003; Wallar and Alberts, 2003; Goode and Eck, 2007; Bartolini and Gundersen, 2010). However, the known activators/effectors of diap3 are ubiquitously expressed. On the other hand, diap3 is highly regulated (Wallar and Alberts, 2003). Thus, a unique suppressor/inhibitor present in OHCs and not IHCs may leave OHCs unaffected. Therefore, we cannot definitively exclude the presence of unknown protein partners, exclusively expressed in one of the hair-cell populations, which modulate diap3 or undergo a diaphanous-dependent regulation. Finally, a difference in actin or microtubules metabolism in OHC vs IHC might also explain the difference of phenotype between both hair cells.

Diap3-over expressing mice replicate human AUNA1 hearing loss

To decipher the mechanism of the auditory neuropathy AUNA1, caused by the overexpression of the formin protein diap3, we further investigated diap3-overexpressing Tg mice (Schoen et al., 2013). Our results demonstrate that these mutants replicate to some extent the AUNA1 features, i.e., a progressive hearing loss leaving OHCs largely unaffected. A more rapidly progressive threshold shift and a slight reduction of the DPOAEs amplitude were observed in the 771 mouse line, which can be attributed to the morphological alteration and loss

of a larger fraction of OHCs in this line. The different degree of OHCs vulnerability between the 924 and 771 lines might be due to the different number of transgene copies and thus in the diap3 expression between both genotypes. Thus, beyond a level of protein expression, the anatomical defects would not only be restricted to IHCs but would also occur in OHCs, leading ultimately to the degeneration of these cells. However, the mRNA expression level of diap3 is similar between both genotypes (Schoen et al., 2013), challenging this hypothesis. Alternatively, the transgene insertion site might differ between the two lines, and thus have a different impact on the survival of OHCs between both diap3-overexpressing lines.

We identify diap3 as a novel component of the stereociliary bundle of IHCs and OHCs, and of the IHC cuticular plate. Identifying a new molecular component increases our understanding of IHC dynamics by demonstrating a novel mechanism of deafness in the collection of disorders known as auditory neuropathy. Deciphering the mechanism of AUNA1 deafness will be the first step to developing a treatment for patients affected with this form of deafness.

References

Bartolini F, Gundersen GG (2010) Formins and microtubules. Biochim Biophys Acta 1803:164–173.

Bartolini F, Moseley JB, Schmoranzer J, Cassimeris L, Goode BL, Gundersen GG (2008) The formin mDia2 stabilizes microtubules independently of its actin nucleation activity. J Cell Biol 181:523–536.

Beurg M, Fettiplace R, Nam J-H, Ricci AJ (2009) Localization of inner hair cell mechanotransducer channels using high-speed calcium imaging. Nat Neurosci 12:553–558.

Bobbin RP, Fallon M, Kujawa SG (1991) Magnitude of the negative summating potential varies with perilymph calcium levels. Hear Res 56:101–110.

Bobbin RP, Jastreboff PJ, Fallon M, Littman T (1990) Nimodipine, an L-channel Ca2+ antagonist, reverses the negative summating potential recorded from the guinea pig cochlea. Hear Res 46:277–287.

Corey DP, Hudspeth AJ (1983) Analysis of the microphonic potential of the bullfrog's sacculus. J Neurosci 3:942–961.

DeRosier DJ, Tilney LG (1989) The structure of the cuticular plate, an in vivo actin gel. J Cell Biol 109:2853–2867.

DeWard AD, Alberts AS (2009) Ubiquitin-mediated degradation of the formin mDia2 upon completion of cell division. J Biol Chem 284:20061–20069.

Drenckhahn D, Engel K, Höfer D, Merte C, Tilney L, Tilney M (1991) Three different actin filament assemblies occur in every hair cell: each contains a specific actin crosslinking protein. J Cell Biol 112:641–651.

Drummond MC, Barzik M, Bird JE, Zhang D-S, Lechene CP, Corey DP, Cunningham LL, Friedman TB (2015) Live-cell imaging of actin dynamics reveals mechanisms of stereocilia length regulation in the inner ear. Nat Commun 6:6873.

Ercan-Sencicek AG et al. (2015) Homozygous loss of DIAPH1 is a novel cause of microcephaly in humans. Eur J Hum Genet 23:165–172.

Evangelista M, Zigmond S, Boone C (2003) Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. J Cell Sci 116:2603–2611.

Farris HE, Wells GB, Ricci AJ (2006) Steady-state adaptation of mechanotransduction modulates the resting potential of auditory hair cells, providing an assay for endolymph [Ca2+]. J Neurosci 26:12526–12536.

Fettiplace R, Kim KX (2014) The physiology of mechanoelectrical transduction channels in hearing. Physiol Rev 94:951–986.

Flock A, Cheung HC (1977) Actin filaments in sensory hairs of inner ear receptor cells. J Cell Biol 75:339–343.

Fuchs PA, Glowatzki E, Moser T (2003) The afferent synapse of cochlear hair cells. Curr Opin Neurobiol 13:452–458.

Furness DN, Hackney CM, Steyger PS (1990) Organization of microtubules in cochlear hair cells. J Electron Microsc Tech 15:261–279.

Furness DN, Katori Y, Mahendrasingam S, Hackney CM (2005) Differential distribution of beta- and gamma-actin in guinea-pig cochlear sensory and supporting cells. Hear Res 207:22–34.

Furness DN, Mahendrasingam S, Ohashi M, Fettiplace R, Hackney CM (2008) The dimensions and composition of stereociliary rootlets in mammalian cochlear hair cells: comparison between high- and low-frequency cells and evidence for a connection to the lateral membrane. J Neurosci 28:6342–6353.

Goode BL, Eck MJ (2007) Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. Annu Rev Biochem 76:593–627.

Greene CC, McMillan PM, Barker SE, Kurnool P, Lomax MI, Burmeister M, Lesperance MM (2001) DFNA25, a novel locus for dominant nonsyndromic hereditary hearing impairment, maps to 12q21-24. Am J Hum Genet 68:254–260.

Higgs HN (2005) Formin proteins: a domain-based approach. Trends Biochem Sci 30:342–353.

Ishizaki T, Morishima Y, Okamoto M, Furuyashiki T, Kato T, Narumiya S (2001) Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. Nat Cell Biol 3:8–14.

Jensen-Smith HC, Eley J, Steyger PS, Ludueña RF, Hallworth R (2003) Cell type-specific reduction of beta tubulin isotypes synthesized in the developing gerbil organ of Corti. J Neurocytol 32:185–197.

Johnson SL, Beurg M, Marcotti W, Fettiplace R (2011) Prestin-driven cochlear amplification is not limited by the outer hair cell membrane time constant. Neuron 70:1143–1154.

Kim TB, Isaacson B, Sivakumaran TA, Starr A, Keats BJB, Lesperance MM (2004) A gene responsible for autosomal dominant auditory neuropathy (AUNA1) maps to 13q14-21. J Med Genet 41:872–876.

Kitajiri S-I, Sakamoto T, Belyantseva IA, Goodyear RJ, Stepanyan R, Fujiwara I, Bird JE, Riazuddin S, Riazuddin S, Ahmed ZM, Hinshaw JE, Sellers J, Bartles JR, Hammer JA, Richardson GP, Griffith AJ, Frolenkov GI, Friedman TB (2010) Actin-bundling protein TRIOBP forms resilient rootlets of hair cell stereocilia essential for hearing. Cell 141:786–798.

Kovar DR (2006) Molecular details of formin-mediated actin assembly. Curr Opin Cell Biol 18:11–17.

Krey JF, Sherman NE, Jeffery ED, Choi D, Barr-Gillespie PG (2015) The proteome of mouse vestibular hair bundles over development. Sci Data 2:150047.

Kros CJ, Crawford AC (1990) Potassium currents in inner hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. J Physiol (Lond) 421:263–291.

Liberman MC (1987) Chronic ultrastructural changes in acoustic trauma: serial-section reconstruction of stereocilia and cuticular plates. Hear Res 26:65–88.

Marcotti W, Johnson SL, Holley MC, Kros CJ (2003) Developmental changes in the expression of potassium currents of embryonic, neonatal and mature mouse inner hair cells. J Physiol (Lond) 548:383–400.

Moser T, Starr A (2016) Auditory neuropathy - neural and synaptic mechanisms. Nat Rev Neurol.

Nouvian R (2007) Temperature enhances exocytosis efficiency at the mouse inner hair cell ribbon synapse. J Physiol (Lond) 584:535–542.

Oliver D, Knipper M, Derst C, Fakler B (2003) Resting potential and submembrane calcium concentration of inner hair cells in the isolated mouse cochlea are set by KCNQ-type potassium channels. J Neurosci 23:2141–2149.

Palazzo AF, Cook TA, Alberts AS, Gundersen GG (2001) mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. Nat Cell Biol 3:723–729.

Pruyne D, Evangelista M, Yang C, Bi E, Zigmond S, Bretscher A, Boone C (2002) Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. Science 297:612–615.

Rance G, Starr A (2015) Pathophysiological mechanisms and functional hearing consequences of auditory neuropathy. Brain 138:3141–3158.

Schneider ME, Belyantseva IA, Azevedo RB, Kachar B (2002) Rapid renewal of auditory hair bundles. Nature 418:837–838.

Schoen CJ, Burmeister M, Lesperance MM (2013) Diaphanous homolog 3 (Diap3) overexpression causes progressive hearing loss and inner hair cell defects in a transgenic mouse model of human deafness. PLoS ONE 8:e56520.

Schoen CJ, Emery SB, Thorne MC, Ammana HR, Sliwerska E, Arnett J, Hortsch M, Hannan F, Burmeister M, Lesperance MM (2010) Increased activity of Diaphanous homolog 3 (DIAPH3)/diaphanous causes hearing defects in humans with auditory neuropathy and in Drosophila. Proc Natl Acad Sci USA 107:13396–13401.

Slepecky N, Chamberlain SC (1985) Immunoelectron microscopic and immunofluorescent localization of cytoskeletal and muscle-like contractile proteins in inner ear sensory hair cells. Hear Res 20:245–260.

Starr A, Isaacson B, Michalewski HJ, Zeng F-G, Kong Y-Y, Beale P, Paulson GW, Keats BJB, Lesperance MM (2004) A dominantly inherited progressive deafness affecting distal auditory nerve and hair cells. J Assoc Res Otolaryngol 5:411–426.

Starr A, Picton TW, Sininger Y, Hood LJ, Berlin CI (1996) Auditory neuropathy. Brain 119 (Pt 3):741–753.

Steyger PS, Furness DN, Hackney CM, Richardson GP (1989) Tubulin and microtubules in cochlear hair cells: Comparative immunocytochemistry and ultrastructure. Hear Res 42:1–16.

Vranceanu F, Perkins GA, Terada M, Chidavaenzi RL, Ellisman MH, Lysakowski A (2012) Striated organelle, a cytoskeletal structure positioned to modulate hair-cell transduction. Proc Natl Acad Sci USA 109:4473–4478.

Wallar BJ, Alberts AS (2003) The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. Trends Cell Biol 13:435–446.

Wen Y, Eng CH, Schmoranzer J, Cabrera-Poch N, Morris EJS, Chen M, Wallar BJ, Alberts AS, Gundersen GG (2004) EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. Nat Cell Biol 6:820–830.

Zhang D-S, Piazza V, Perrin BJ, Rzadzinska AK, Poczatek JC, Wang M, Prosser HM, Ervasti JM, Corey DP, Lechene CP (2012) Multi-isotope imaging mass spectrometry reveals slow protein turnover in hair-cell stereocilia. Nature.

Figures & legends

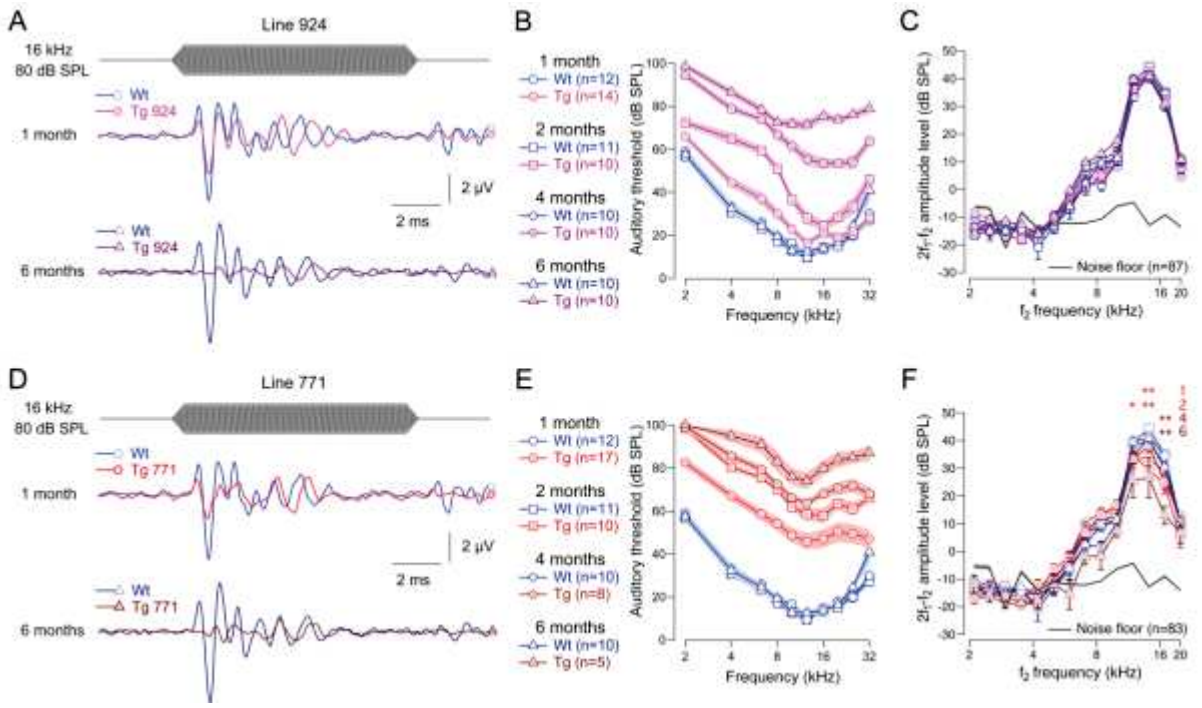


Figure 1: Transgenic mouse lines 924 (Tg 924) and 771 (Tg 771) mimic human AUNA1 deafness. (**A, D**) Representative auditory brainstem response (ABR) recordings evoked by 16 kHz tone burst at 80 dB SPL from 1- and 6-month-old wild type (WT), Tg 924 (**A**) and Tg 771 (**D**) mice. (**B**, **E**) Mean ABR audiograms from 1- to 6-month-old WT, Tg 924 (**B**) and Tg 771 (**E**) mice. (**C**, **F**) Distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) from 1- to 6-month-old WT, Tg 924 (**C**) and Tg 771 (**F**) mice. The mean 2f1-f2 amplitude level is shown as a function of f2 frequency. The black line indicates the background noise level. n indicates the number of cochleae recorded. Level of significance is given by the stars with *p<0.05; **p<0.01 ; ***p< 0.001 (Wilcoxon test). For (**B**) and (**E**), stars which are located next to the audiograms indicate a similar p-value for all the frequencies, except when otherwise noted.

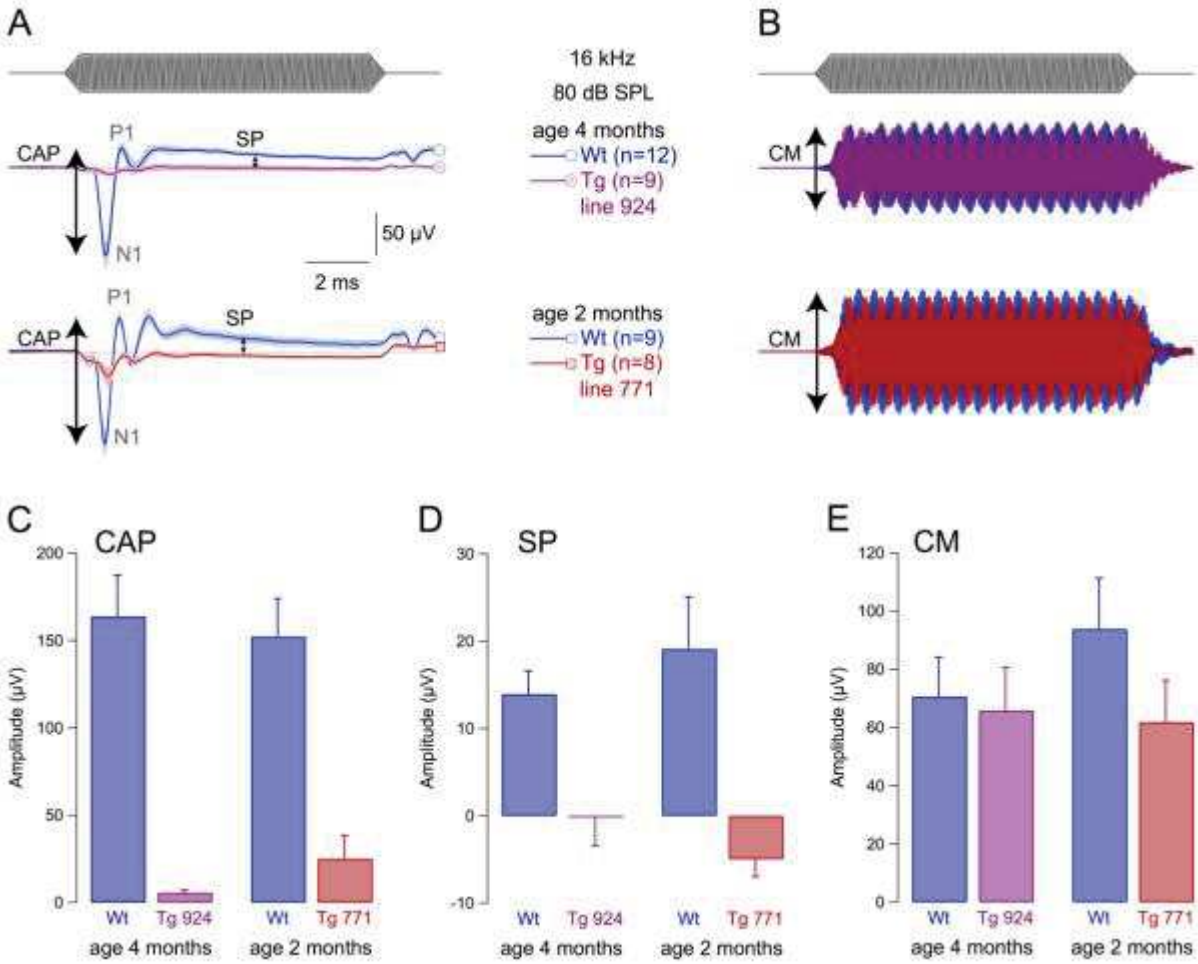


Figure 2: Inner hair cell receptor potential is altered in diap3-overexpressing mice. (**A**) Mean compound action potential (CAP; N_1-P_1 amplitude) and summating potential (SP), reflecting the auditory afferent fiber activation and IHC receptor potential, respectively. (**B**) Cochlear microphonic (CM), reflecting the OHC activation. CAP, SP and CM were evoked by 16 kHz tone burst at 80 dB SPL in 4-month-old wild-type (WT) and Tg 924 mice and 2-month-old WT and Tg 771 mice. (**C**-**E**) Mean CAP amplitude (**C**), SP amplitude (**D**) and CM amplitude (**E**) from 4-month-old WT and Tg 924 mice and 2-month-old WT and Tg 771 mice. n indicates the number of cochleae recorded. Level of significance is given by the stars with ***p< 0.001 (Wilcoxon test).

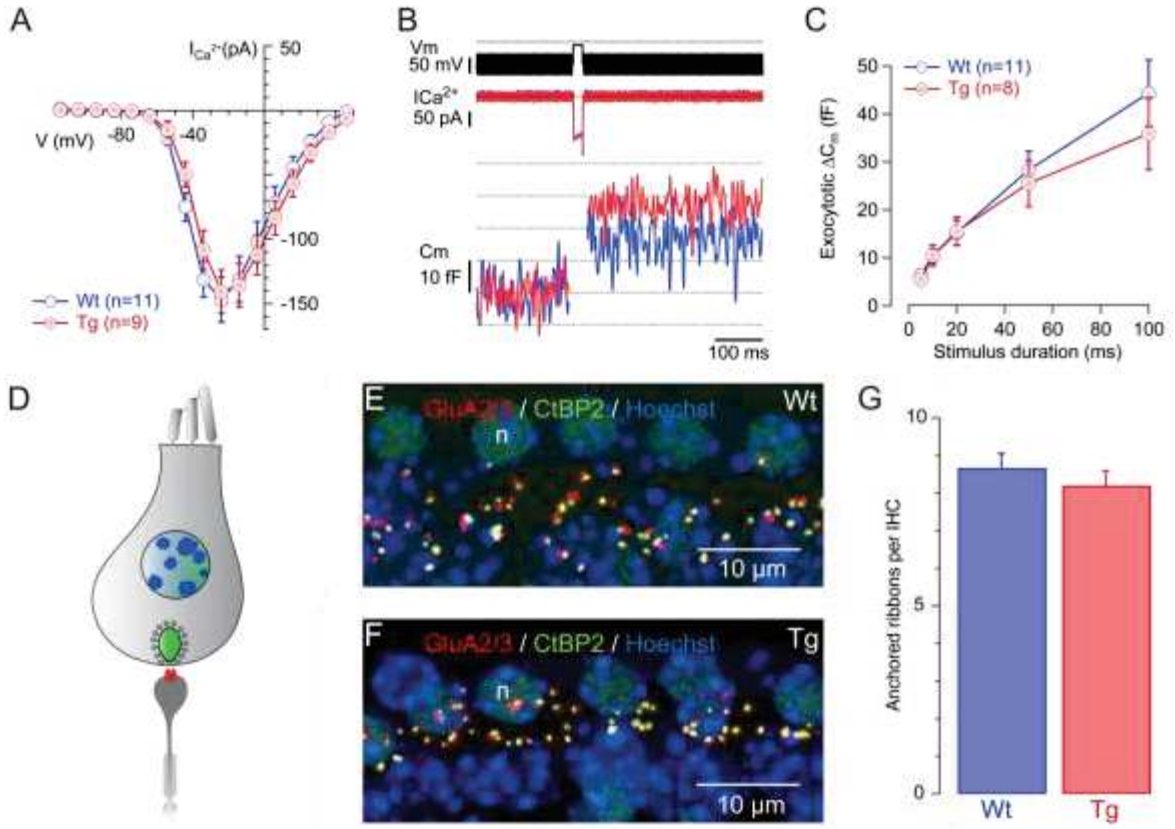


Figure 3: Ca^{2+}-triggered exocytosis is not impaired in diap3-overexpressing mice. (**A**) Ca^{2+} current steady-state I/V relationships of WT (blue) and Tg 771 (red) mice IHCs between 13 to 16 postnatal days (P13-16). Steady-state amplitude was measured as the average over the last 5 ms of the 10 ms test pulse. (**B**) Ca^{2+} current (ICa^{2+}) and membrane capacitance (Cm) traces, low-pass filtered at 100 Hz traces (from top to bottom) of representative WT (blue) and Tg (red) IHCs elicited by 20 ms depolarization to the peak Ca^{2+} current potential. (**C**) Kinetics of exocytosis (Cm) of WT (blue) and Tg (red) IHCs. (**D**) Scheme illustrating the synapse between IHC and afferent neuron. The IHC nucleus is shown in blue, the synaptic ribbon in green, and the post-synaptic glutamate receptor in red. (**E-G**) Comparable number of IHC ribbon synapses between WT and Tg 771 mice. Presynaptic ribbons and postsynaptic glutamate receptors are labeled using antibodies against CtBP2 and GluA2/3, respectively (**E**, **F**). (**G**) Note the comparable numbers of ribbon-containing afferent synapses per IHC from 1-month-old WT (8.67 ± 0.38 synapse/IHCs, n=79 IHCs examined) and Tg 771 mice (8.19 ± 0.39, n=92 IHCs examined). No significant difference was found ($p>0.05$), n.s: not significant.

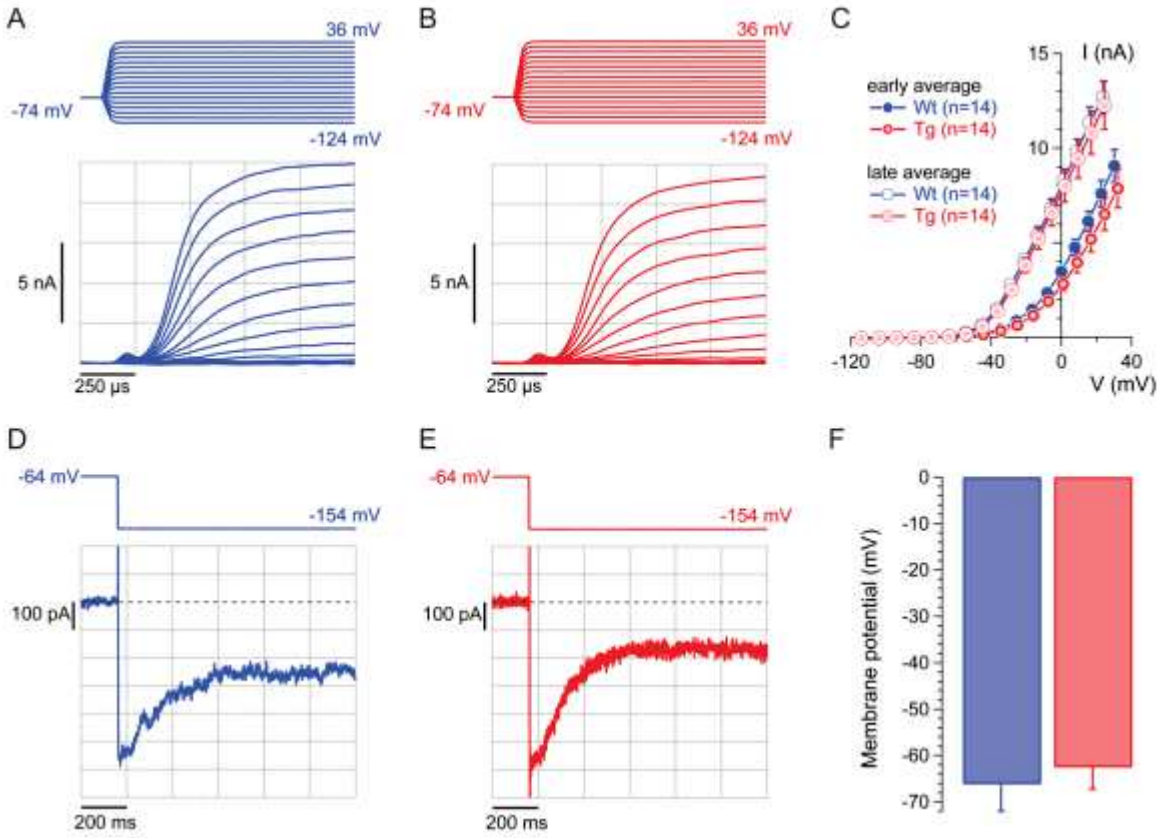


Figure 4: Normal potassium currents in diap3-overexpressing mice. (**A-B**) Representative outward currents recorded from 1-month-old WT (blue) and Tg 771 (red) IHCs. Currents were evoked by step depolarizations from a holding potential of -74 mV to the indicated potentials (voltage increment was 10 mV). (**C**) Average I-V relationships for WT (in blue) and Tg 771 (in red) IHCs derived from averaging currents 375 µs after the start of the depolarizing pulses over 250 µs (early average) and over the last 50 ms of depolarization steps (late average). Early and late averages indicate, respectively, fast- and slow- activating potassium current, corresponding to BK and delayed-rectifier channels. n indicates the number of IHCs recorded. (**D-E**) Representative current traces obtained from 1-month-old WT (blue, **D**) and Tg 771 (red, **E**) IHCs. Currents were elicited by a voltage step from a holding potential of -64 mV to a hyperpolarized potential of -154 mV. Zero current level is indicated by a dotted line. Note that the current was already activated at the resting potential of approximately -60 mV and became deactivated upon hyperpolarization, which is indicative of KCNQ4 currents. (**F**) Mean resting membrane potential of WT (blue) and Tg 771 (red) IHCs (no current injection). The resting membrane potentials were not significantly different between the genotypes.

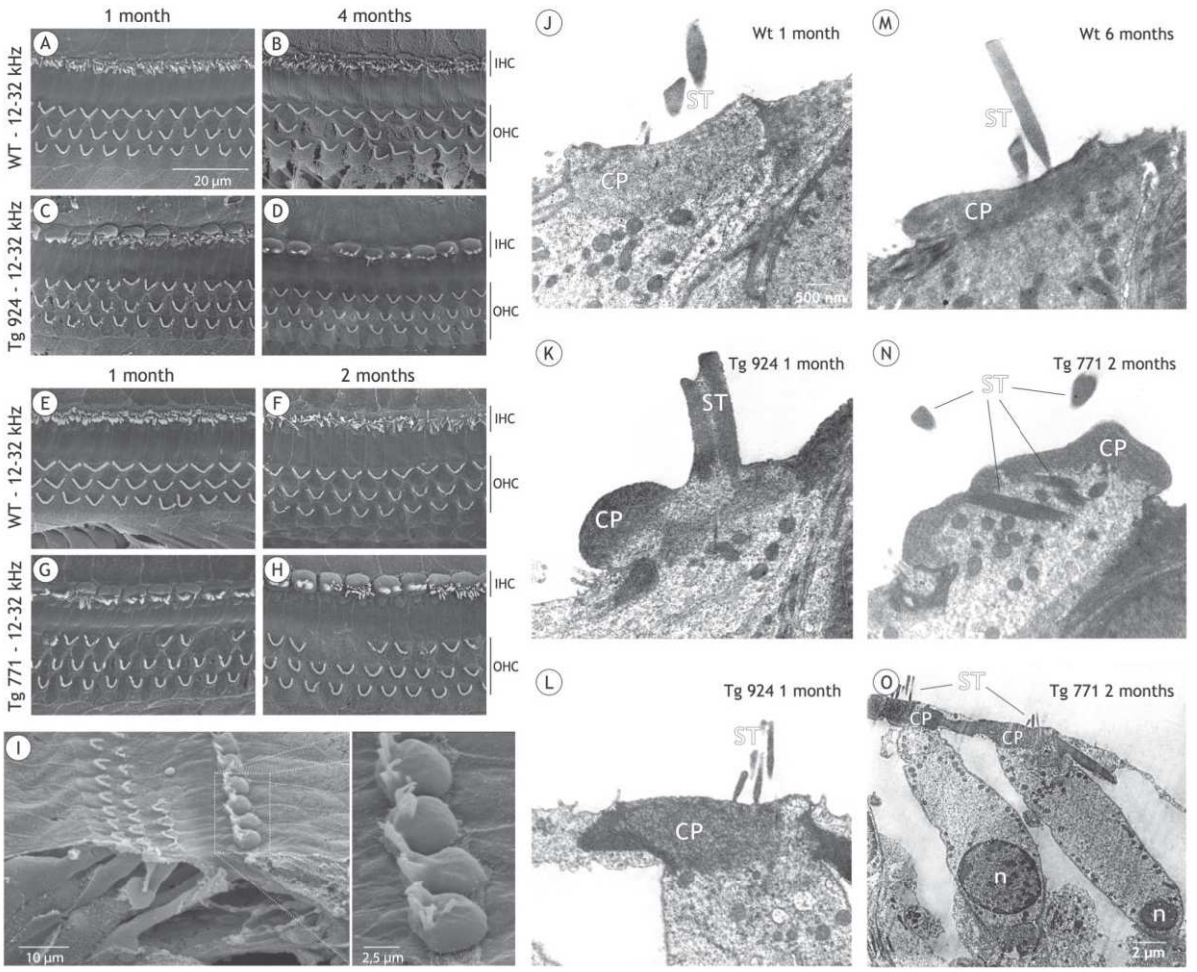


Figure 5: Morphological defects at the cuticular plate and stereociliar bundles in inner hair cells of diap3-overexpressing mice. (A-J) Scanning electron microscopy of the organ of Corti in 1- (**A**, **E**), 4- (**B**) and 2- (**F**) month-old WT, in 1- (**C**) and 4- (**D, I-J**) month-old Tg 924 and in 1- (**G**) and 2- (**H**) month-old Tg 771 mice. Note the cuticular plate lump (white asterisk) in WT inner hair cells (IHCs) starting from 4-month-old (**B**). In the Tg lines (**C-D**, **G-J**), a severe swelling of the IHC cuticular plate is observed for all the ages. The alteration of the cuticular plate can be associated with disarrayed or fused stereociliar bundle. In addition, some outer hair cells (OHCs) are missing. (**K-P**) Transmission electron microscopy (TEM) from hair cells in 1- (**K**) and 6- (**N**) month-old WT, in 1- (**L, M**) month-old Tg 924 and in 2- (**O, P)** month-old Tg 771 mice. (**K**) In 1-month-old WT mice, the cuticular plate (CP) forms an electron-dense matrix, which is homogenously distributed at the IHC apical pole, except at the fonticulus. Note the presence of numerous mitochondria below the CP and the well-organized stereocilia (ST) above. (**N**) In 6-month-old WT mice, the CP has still a homogenous distribution. Note that the CP its area expands over the neighboring supporting cell (black asterisk), although TEM did not show swelling comparable to that seen in the Tg mice. (**L**) In 1-month-old Tg 924 mice, the CP dramatically accumulated at the border of the IHC

and the ST are fused. (**M**) In 1-month-old Tg 924 mice, the apical pole of OHCs looks normal with its CP anchoring the ST bundle. (**O**) In 2-month-old Tg 771 mice, the ST are embedded in the IHC cytoplasm. The CP is not confined to its regular position and the apical pole of the IHC protrudes toward the *scala media*. Note the discontinuous CP (arrow). (**P**) In 2-month-old Tg 771 mice, OHCs show a normal appearance with the CP anchoring the ST bundle. Scale bars: A-H: 20 µm, I: 10 µm, J: 2.5 µm, K-O: 500 nm, P: 2 µm.

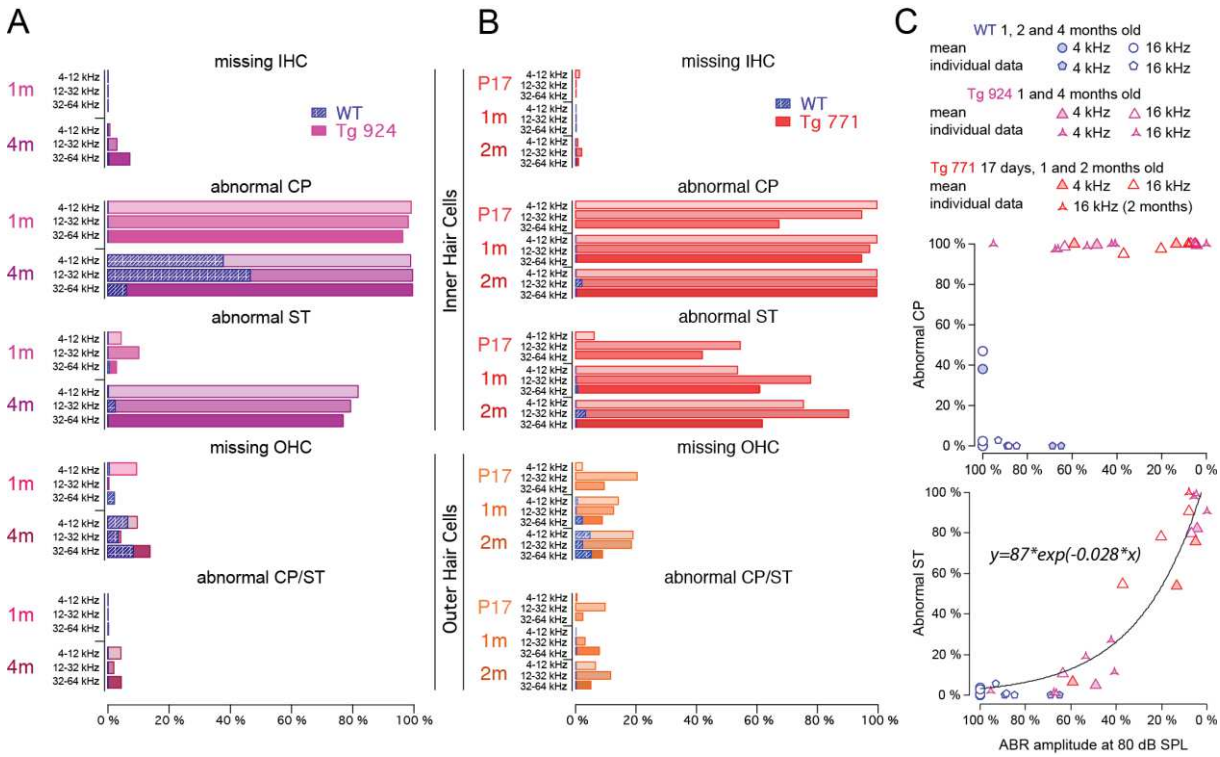


Figure 6: Quantification of the anatomical alteration in hair cells of diap3-overexpressing mice. (A- B) Abnormal CP indicates the increase of the cuticular plate area. Abnormal ST indicates disarrayed or fused stereocilia. Note that 4-month-old WT mice exhibit a large cuticular plate that could not be easily distinguished from diap3-overexpressing mice. For OHCs, abnormal CP and ST were pooled because of the minimal defect observed in these cells. (**C**) *top,* fraction of IHCs with an abnormal CP plotted against the reduction in the ABR amplitude probed at 80 dB SPL. ABR with various amplitude reductions (0 to 90 %) can be measured with 100 % IHCs harboring a swollen cuticular plate. (**C**) *bottom,* fraction of IHCs harboring an abnormal ST plotted against the reduction in the ABR amplitude probed at 80 dB SPL. The relationship between the reduction in ABR amplitude and the alteration in the stereociliar bundle can be fitted by the following exponential: y =a*exp(b*x), where y is the fraction of IHCs with abnormal stereocilia, x the reduction in the ABR amplitude and a and b

are constants. For (**C**), the mean values correspond to the degree of anatomical damage in the 4 and 16 kHz coding frequency regions from 1-, 2- and 4-month-old mice and plotted against the ABR amplitude average at the corresponding coding frequencies (4 and 16 kHz) from different groups of 1-, 2- and 4-month-old mice. Individual data values correspond to the anatomo-functional correlation that has been obtained in the same mice.

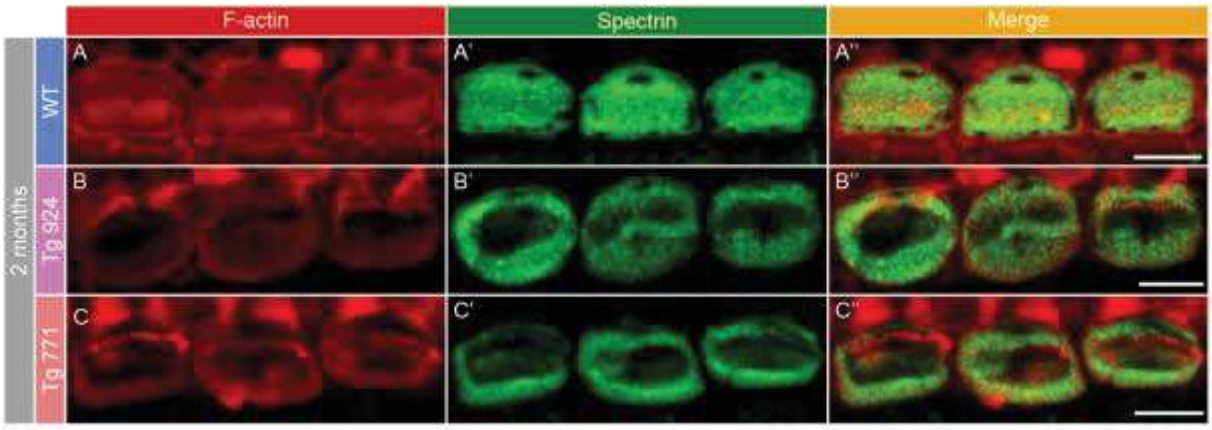


Figure 7: Disorganization of the cuticular plate components. (**A-A"**) In 2-month-old WT IHCs, F-actin (red, **A**) and spectrin (green, **A'**) are homogeneously distributed in the whole cuticular plate, except for the kinocilium imprint. (**A"**) Merge of both labelings. (**B-C"**) In 2-month-old Tg 924 (**B-B"**) and Tg 771 (**C-C"**) mice, actin filaments and spectrin are concentrated toward the periphery of the IHC apical part leaving an empty space at the cuticular plate center. Scale bars: 5 µm

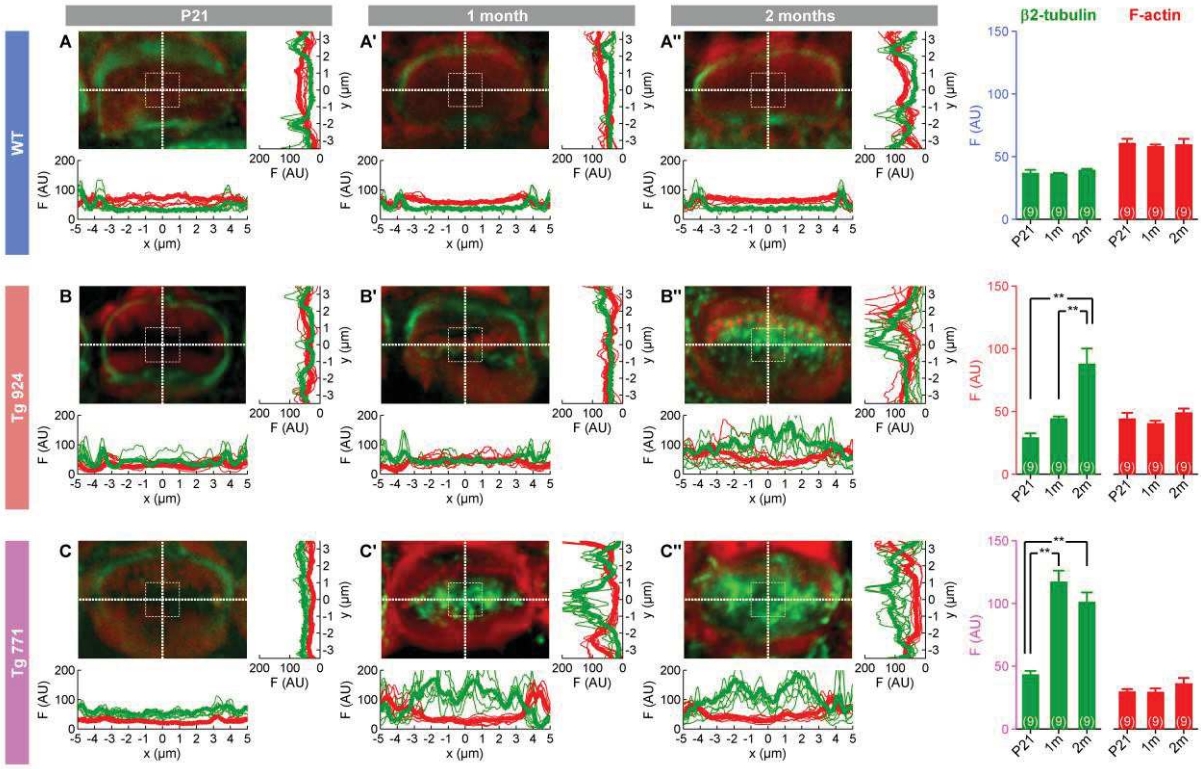


Figure 8: Microtubule network remodeling in inner hair cells of diap3-overexpressing mice. (A-C") Fluorescence intensity distribution of microtubules (green) and F-actin (red) at the cuticular plate section through x and y sections in WT (**A-A"**), Tg 771 (**B-B"**) and Tg 924 (**C-C"**) lines at 21 postnatal days (P21, **A**, **B**, **C**), 1- (**A'**, **B'**, **C'**) and 2- (**A"**, **B"**, **C"**) month-old. Actin filaments are labeled using phalloidin-rhodamine (red) and microtubules are stained using an antibody against the β2-tubulin subunit (green). Pictures show a high-magnification of the cuticular plate section over a single IHC. Thick and thin lines represent the average and individual fluorescence intensities (n=9 IHCs in each conditions), respectively. *Right:* Histograms show the fluorescence average from an area of 4 μm^2 located at the image center for the different genotypes and age. AU: arbitrary unit. ***p*<0.01 (Student's t-test).

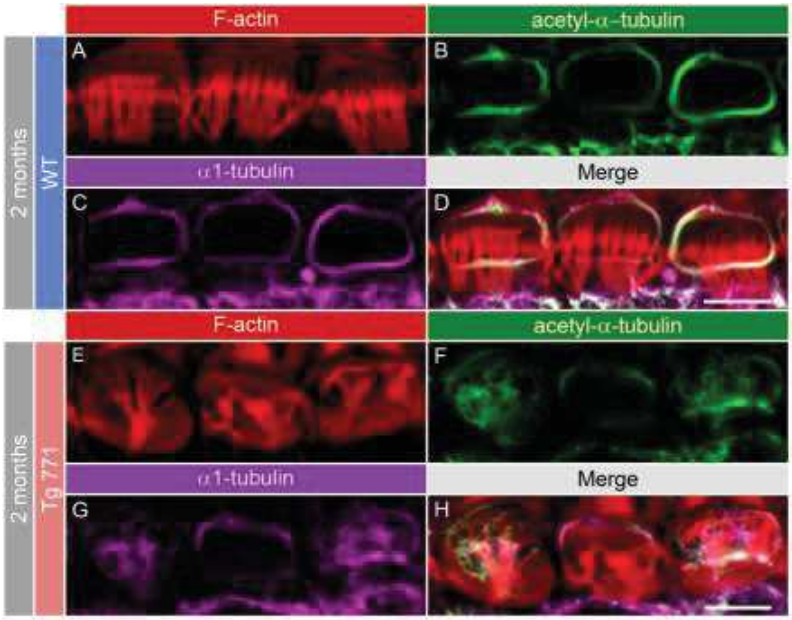


Figure 9: Acetylated-microtubules populate the cuticular plate center in the diap3-overexpressing mice. (**A-H**) F-actin and microtubules distribution at the IHC apical side from 2-month-old WT (**A-D**) and Tg 771 (**E-H**) mice. Actin filaments are labeled by phalloidin-rhodamine (red, **A**, **E**) and microtubules are stained using antibody against the acetyl-α1-tubulin (green, **B, F**) or against the α1-tubulin subunit (magenta, **C, G**). Scale bars: 5 µm.

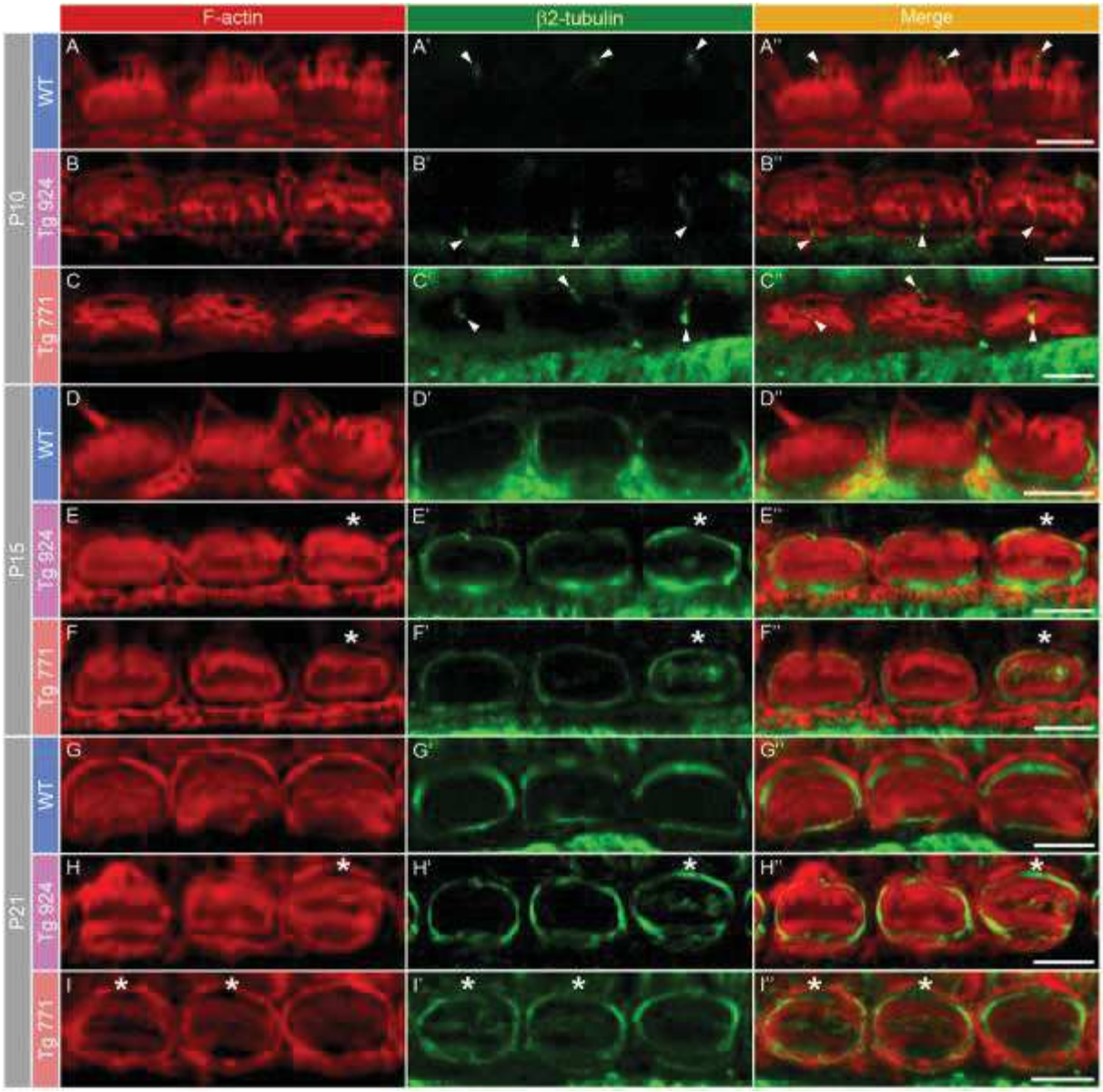


Figure 10: Early-onset of the microtubule remodeling. F-actin and microtubules distribution at the IHC apical side from WT (**A, D and G**), Tg 924 (**B, E and H**) and Tg 771 (**C, F** and **I**) mice at 10, 15 and 21 postnatal days (P10, P15 and P21). Actin filaments are labeled by phalloidin-rhodamine (red) and microtubules are stained using antibody against the β2 tubulin subunit (green). (**A-C"**) At P10, the β2-tubulin staining is reminiscent of the kinocilium position (arrowheads). In 2- and 3-week-old WT mice, microtubules are distributed around the cuticular plate (green, **D-D"**, **G-G"**). In the P15 Tg 924 (**E-E"** and **H-H"**) and P21 Tg 771 (**F-F"** and **I-I"**), microtubules can be readily distinguished in the center of the cuticular plate below the stereociliar bundle (asterisk). Scale bars: 5 µm.

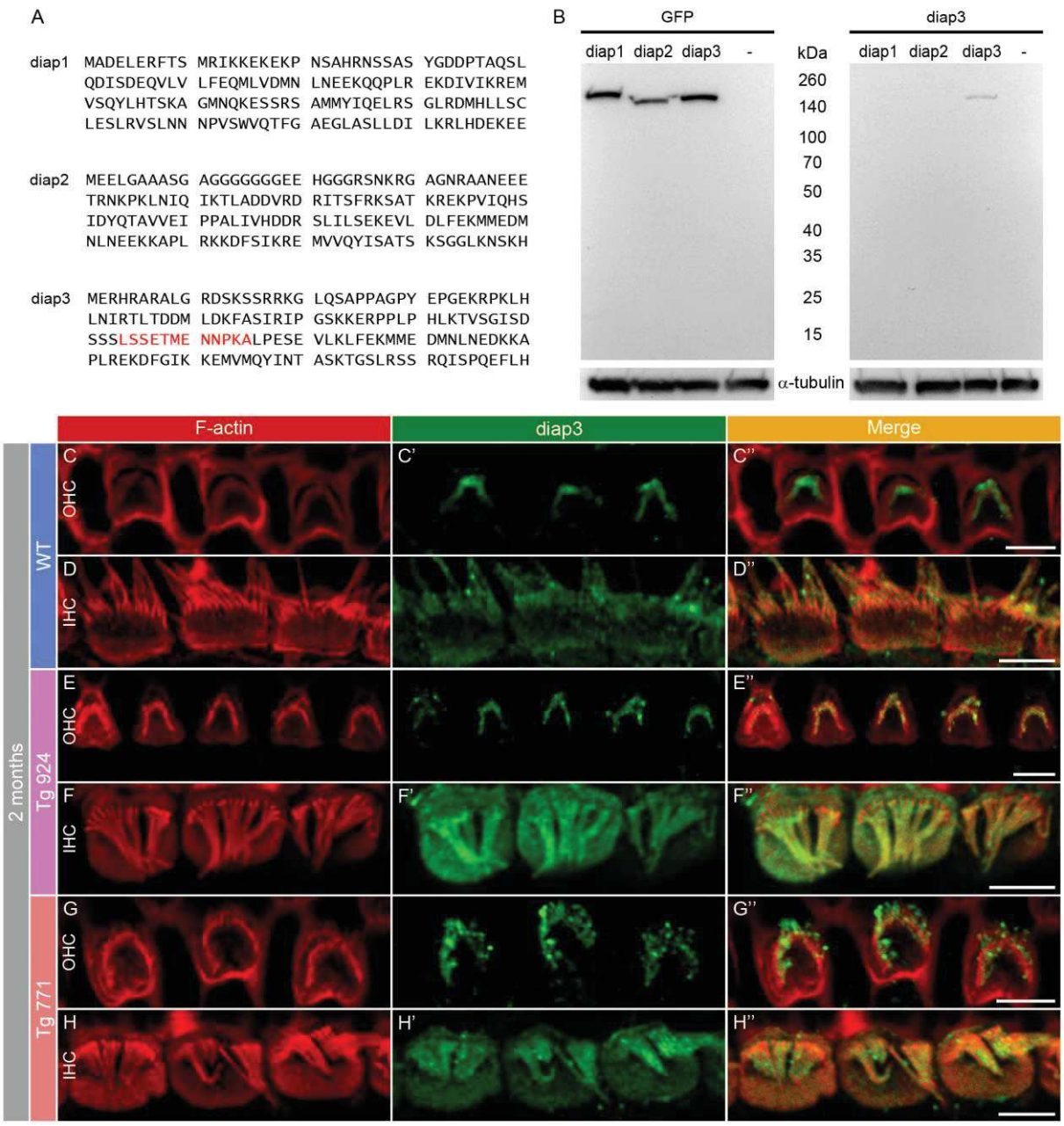


Figure 11: Accumulation of diap3 in the cuticular plate of IHCs of diap3-overexpressing mice. (**A**) Amino acid (1-120) sequence of mouse diap1, diap2 and diap3. The LSSETMENNPKA motif in the diap3 protein sequence (red) has been used to generate the diap3 antibody. (**B**) Western blot analysis of diap3 antibody specificity. HEK293 cells were transfected in parallel with plasmids encoding the GFP-diap1, -diap2 or -diap3 fusion protein. Protein extracts from HEK293 cells were probed with GFP (upper right panel) and diap3 (upper left panel) antibodies. '-' refers to non transfected HEK293 cells. GFP staining indicates efficient expression for each diap-GFP fusion protein in HEK293 cells (at ~160 kDa). Note that the diap3 antibody recognizes diap3-GFP protein but not diap1-GFP neither diap2-GFP proteins. On lower panels, α-tubulin staining are used as protein loading control. (**C-D"**) F-

actin and diap3 localization at the apical side of OHCs (**C-C”**) and IHCs (**D-D”**) in 2-month-old WT mice. Actin filaments are labeled by phalloidin-rhodamine (red, **C-D**) and diap3 is stained using an anti-diap3 antibody (green, **C’-D’**). Diap3 is preferentially localized inside the stereocilia of both hair cells (**C’-D’**) and within the cuticular plate of IHCs (**D’**). (**C”-D”**) Merge of both immunolabelings. (**E-H”**) Localization of F-actin and diap3 in 2-month-old Tg 924 (**E-F”**) and Tg 771 (**G-H”**) mice. Actin filaments are concentrated toward the periphery of the IHC apical part leaving an actin-free zone in the IHC cuticular plate center (**F**, **H**). In the Tg 771 (**E’-F’**) and Tg 924 (**G’-H’**) mice, diap3 accumulates in the cuticular plate and stereocilia of IHCs (**F’-H’**), and only shows a stereociliary bundle localization in OHCs (**E’-G’**). Scale bars: 5 µm.

Résumé

La neuropathie auditive est une forme de surdité caractérisée par une atteinte des cellules ciliées internes (qui détectent les ondes sonores et les transforment en message nerveux) et/ou des neurones afférents primaires (qui véhiculent les messages nerveux jusqu'au noyau cochléaire), associée à une activité normale des cellules ciliées externes (qui amplifient les ondes sonores).

AUNA1 est la première neuropathie auditive héréditaire à avoir été décrite. Elle est causée par une mutation ponctuelle située dans le promoteur du gène *DIAPH3*, résultant en une surexpression de *DIAPH3*. La protéine DIAPH3, un membre de la famille des formines, est connue pour promouvoir la nucléation et l'élongation des filaments d'actine ainsi que la stabilisation des microtubules.

Nous avons étudié les mécanismes d'AUNA1 à partir d'un modèle murin transgénique surexprimant le gène *diap3*, l'orthologue murin de *DIAPH3*. Les souris transgéniques développent une surdité dont les caractéristiques sont semblables à celles d'AUNA1. Cette surdité est due à une perte d'activité des cellules ciliées internes. L'activité synaptique et les courants potassiques de ces cellules ne sont pas altérés. En revanche, la microscopie électronique révèle une fusion des stéréocils (expansions cytoplasmiques qui permettent la détection des ondes sonores) et une déformation de la plaque cuticulaire (plateforme qui assure l'ancrage des stéréocils). Par la technique d'immunomarquage, nous avons mis en évidence une invasion de la plaque cuticulaire par des microtubules. Enfin, nous avons démontré que la protéine Diap3 est localisée dans la plaque cuticulaire des cellules ciliées internes, suggérant ainsi que la surexpression de *diap3* provoque un remodelage du réseau de microtubule des cellules ciliées internes, à l'origine de la surdité AUNA1.

Mots-clés : Surdité, Cochlée, Cellule ciliée interne, Diaphanous, Microtubule

Summary

Auditory neuropathy is a type of deafness characterized by an alteration of the inner hair cells (which detect the acoustic waves and transform them into neural messages) and/or of the primary afferent neurons (which conduct the neural messages to the cochlear nucleus), associated with a normal activity of the outer hair cells (which amplify the acoustic waves).

AUNA1 is the first hereditary auditory neuropathy which has been described. It is caused by a point mutation in the promoter of the *DIAPH3* gene, resulting in an overexpression of *DIAPH3*. The DIAPH3 protein, a formin family member, is known to promote the actin filament nucleation and elongation and to stabilize the microtubules.

We studied the AUNA1 mechanisms using a transgenic mouse model which overexpresses the *diap3* gene, the mouse homologue of *DIAPH3*. Transgenic mice develop a deafness whose characteristics are similar to the ones of AUNA1. The hearing loss is due to a defect in the inner hair cell activity. The synaptic activity and the potassium currents of these cells are not altered. However, electron microscopy reveals a fusion of the stereocilia (cytoplasmic expansions which detect the acoustic waves) and a disruption of the cuticular plate (plateform which maintains stereocilia). By immunolabeling, we showed an invasion of the cuticular plate by microtubules. Eventually, we demonstrated that Diap3 is located in the inner hair cell cuticular plate, suggesting that the overexpression of *diap3* provokes a remodeling of the inner hair cell microtubule network, underlying the AUNA1 deafness.

Keywords: Deafness, Cochlea, Inner Hair Cell, Diaphanous, Microtubule