



**HAL**  
open science

# L'organisation spatiale des canaux calciques cav1.3 détermine l'efficacité de l'exocytose des synapses à ruban dans les cellules ciliées de l'oreille interne

Philippe Vincent

► **To cite this version:**

Philippe Vincent. L'organisation spatiale des canaux calciques cav1.3 détermine l'efficacité de l'exocytose des synapses à ruban dans les cellules ciliées de l'oreille interne. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0238 . tel-01969394

**HAL Id: tel-01969394**

**<https://theses.hal.science/tel-01969394v1>**

Submitted on 4 Jan 2019

**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.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé  
SPÉCIALITÉ Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par **Philippe VINCENT**  
Né le 27 Septembre 1988 à Nantes (44)

**L'ORGANISATION SPATIALE DES CANAUX CALCIQUES  
CAV1.3 DÉTERMINE L'EFFICACITÉ DE L'EXOCYTOSE  
DES SYNAPSES À RUBAN DANS LES CELLULES CILIÉES  
DE L'OREILLE INTERNE**

Sous la direction du  
**Dr Didier DULON**

Soutenue publiquement le  
**16 décembre 2015**

Membres du jury :

Stéphane OLIET - Directeur de recherche CNRS, Université de Bordeaux  
Christian CHABBERT - Chargé de recherche CNRS, Université Aix Marseille  
Serge PICAUD - Directeur de recherche INSERM, Institut de la vision  
Saaid SAFIEDDINE - Directeur de recherche CNRS, Institut Pasteur  
Didier DULON - Directeur de recherche INSERM, Université de Bordeaux

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de Thèse

**Equipe neurophysiologie de la synapse auditive  
Inserm U1120 et Université de Bordeaux**

Place Amélie Raba Léon, Hôpital Pellegrin, Bât PQR 3, 3<sup>ème</sup> étage

33076 Bordeaux Cedex

FRANCE

# **Remerciements**



*Au moment où j'écris ces quelques lignes, une aventure de trois ans prend fin. L'heure est venue de remercier l'ensemble des personnes qui m'ont accompagné et même supporté, certains diront (hein mon cher Yohan!!!), pendant ces trois années de ma vie et qui ont été indispensables à l'aboutissement et à la finalisation de cette belle aventure.*

*Avant tout, je veux remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de consacrer une partie de leur temps précieux à l'expertise de mes travaux de recherche. Les docteurs **Stéphane Oliet, Christian Chabbert, Serge Picaud, et Saaid Safieddine.***

*Je voudrais ensuite remercier mon directeur de thèse, le Dr **Didier Dulon**, qui m'a guidé sur ce long chemin parsemé d'embûches. Je le remercie pour sa disponibilité, sa générosité, ses conseils et pour l'ensemble des connaissances qu'il m'a apporté sur ces petits, mais non moins indispensables organes sensoriels que sont la cochlée et le vestibule.*

*Je voudrais ensuite remercier **Yohan Bouleau**, un technicien extraordinaire que je considère un peu comme la fée du logis de notre laboratoire. Yohan a été un soutien indispensable durant ces trois années, et une source de connaissances pour de nombreuses techniques de laboratoire (Biologie Moléculaire, Immunohistofluorescence,...). Je le remercie aussi pour sa disponibilité, pour sa bonne humeur, pour l'ensemble de nos discussions et théories (parfois « farfelues ») sur le fonctionnement de nos synapses à ruban, ainsi que pour toutes ses blagues « plus ou moins » drôles... malheureusement.*

*Un grand merci à **Gilles Charpentier**, enseignant-chercheur à l'université de Bordeaux et **Ombeline de la Rochefoucauld-Rossier**, une post-doc de notre laboratoire. Je les remercie tous les deux pour l'ensemble de nos discussions, leur disponibilité, leur gentillesse et pour toute l'aide qu'ils m'ont apportés pendant ces trois années.*

*Je voudrais remercier **Christine Petit**, professeur au Collège de France et responsable de l'équipe Génétique et Physiologie de l'audition à l'Institut Pasteur ainsi que l'ensemble de son équipe à Paris. Je pense particulièrement à **Saaid Safieddine, Aziz El Amraoui, et Nicholas Michalski**. Je les remercie notamment pour les discussions très intéressantes lors des nombreux congrès internationaux. Je les remercie aussi pour l'ensemble des modèles animaux qu'ils nous ont procurés.*

*Je souhaite aussi remercier **Henrique von Gersdorff** ainsi que toute son équipe travaillant au Vollum Institute à Portland. Nous avons pu démarrer une excellente collaboration sur le projet visant à étudier l'effet des protons sur les canaux calciques des CCI chez les mammifères.*

*Merci aussi à l'équipe de **Pierre Costet** et plus particulièrement **Fadila Fernandez** pour avoir pris soin de nos souris otoferline.*

*Un grand merci à **Margot Tertrais** pour avoir lu ce mémoire et pour ses corrections.*

*Un énorme merci à toutes les personnes chères à mon cœur qui m'ont soutenu pendant ma thèse mais pas seulement. Je veux parler de **mes parents**, de **ma petite sœur** et de mes amis « Nantais » (**Jean Mi, Pio et Thibault**).*

*Pour conclure, je souhaite remercier une personne que je connais depuis cinq ans et qui compte encore plus pour moi depuis le 14 Août 2015. Sa présence et son soutien m'ont été indispensables durant ces derniers mois pour finaliser l'écriture de ma thèse. Merci Mon Amour.*

A Anne-Caroline



# **Sommaire**

<b>Liste des Figures</b> .....	I
<b>Liste des Abréviations</b> .....	IV
<b>Publications Scientifiques</b> .....	VI
<b>Introduction</b> .....	1
1. Généralités.....	2
1.1 Le signal acoustique .....	2
1.2 Pathologies de l'oreille interne et intérêt de la recherche.....	3
a. Epidémiologie .....	3
b. Les surdités neurosensorielles.....	4
c. Les antibiotiques aminoglycosidiques .....	4
2. L'organisation générale de l'oreille .....	6
2.1 L'oreille externe .....	6
2.2 L'oreille moyenne.....	6
2.3 L'oreille interne .....	7
a. La cochlée : organe de l'audition.....	8
b. Le vestibule: organe de l'équilibre .....	8
3. Les épithéliums sensoriels auditif et vestibulaire.....	10
a. L'organe de Corti .....	10
b. L'épithélium vestibulaire .....	10
3.1 Les cellules ciliées sensorielles .....	10
a. L'organe de Corti .....	10
b. L'utricule.....	12
3.2 Morphologie des cellules sensorielles .....	12
a. Les cellules sensorielles auditives .....	12
b. Les cellules sensorielles utriculaires .....	14
3.3 Les cellules sensorielles: des cellules polarisées .....	15
a. Pôle apical des CCI et CCEs .....	15
b. Pôle apical des cellules utriculaires .....	16
c. Pôle baso-latéral et zones actives.....	16
4. La membrane basilaire: un résonateur mécanique .....	21
5. Voies nerveuses auditives et vestibulaires .....	22
5.1 Fibres afférentes et efférentes de l'organe de Corti.....	22
5.2 Fibres afférentes et efférentes du vestibule .....	23
5.3 Les voie nerveuses centrales.....	23
5.4 Techniques d'exploration fonctionnelle du système auditif.....	24
a. Enregistrement unitaire des fibres afférentes auditives .....	24
b. Mesure des potentiels cochléaires composites.....	25
c. Enregistrements des PAEs .....	25

6.	Les récepteurs post-synaptiques glutamatergiques .....	26
6.1	Les familles de récepteurs au glutamate.....	26
6.2	Structure des récepteurs glutamatergiques .....	26
6.3	Les récepteurs glutamatergiques des fibres afférentes auditives et vestibulaires.....	27
6.4	Les récepteurs glutamatergiques de la rétine.....	27
7.	Transmission synaptique: transduction du potentiel microphonique en impulsions nerveuses .....	29
7.1	Mécanisme général .....	29
7.2	Les étapes de l'exocytose synaptique.....	30
7.3	Les acteurs moléculaires de l'exocytose .....	30
a.	Le système nerveux central.....	30
b.	Les photorécepteurs et les cellules bipolaires de la rétine .....	32
c.	Les cellules ciliées sensorielles: des synapses non-conventionnelles.....	33
7.4	Les vésicules à glutamate .....	34
a.	Mécanisme de chargement vésiculaire en glutamate.....	34
b.	La pompe à proton vésiculaire: V-ATPase.....	35
c.	Les transporteurs vésiculaires glutamatergiques: V-GLUT .....	36
7.5	Le signal calcique et sa modulation.....	36
8.	Fusion multi-vésiculaire ou fusion uni-vésiculaire ? .....	37
9.	L'endocytose des cellules ciliées sensorielles.....	39
10.	Les senseurs calciques: la « gâchette » de l'exocytose.....	41
10.1	Les synaptotagmines.....	41
10.2	Les ferlines .....	41
10.3	Les senseurs calciques des cellules sensorielles .....	43
a.	Les photorécepteurs et les cellules bipolaires .....	43
b.	L'otoférine: le senseur calcique des cellules ciliées ? .....	43
10.4	Quelles sont les étapes de l'exocytose contrôlées par l'otoférine ? .....	45
11.	Les canaux calciques voltage-dépendants.....	47
11.1	La famille des canaux calciques voltage-dépendant .....	47
11.2	Structure moléculaire des canaux calciques.....	47
a.	La sous-unité $\alpha 1$ .....	47
b.	Les sous-unités auxiliaires du canal calcique .....	48
11.3	L'inactivation des canaux calciques .....	50
a.	L'inactivation dépendante du voltage.....	50
b.	L'inactivation dépendante du calcium .....	50
c.	L'inactivation dépendante des protons .....	51
d.	Les isoformes courtes et longues des canaux calciques Cav1.3 .....	51
11.4	Les canaux calciques des cellules sensorielles de la rétine et de l'oreille interne .	52
a.	Les photorécepteurs et les cellules bipolaires .....	52

b. Les cellules sensorielles auditives .....	53
c. Les cellules sensorielles vestibulaires.....	54
d. Les isoformes du canal calcique Cav1.3 dans les cellules ciliées sensorielles .....	54
<b>Objectifs</b> .....	55
<b>Résultats</b> .....	57
<b>Article 1:</b> Exocytotic Machineries of Vestibular Type I and Cochlear Ribbon Synapses Display Similar Intrinsic Otoferlin-Dependent $\text{Ca}^{2+}$ Sensitivity But a Different Coupling to $\text{Ca}^{2+}$ Channels.....	58
<b>Article 2:</b> Transient and Sustained Exocytosis at the Auditory Hair Cell Ribbon Synapse Involve Different Cav1.3 Channel Isoforms .....	77
<b>Article 3:</b> Transient Block of $\text{Ca}^{2+}$ Channels by Exocytosed Protons Reveals Otoferlin-Regulated Multivesicular Release at Mammalian Auditory Hair Cell Ribbon Synapses .....	111
<b>Article 4:</b> A Synaptic F-Actin Network Controls Otoferlin-Dependent Exocytosis in Auditory Inner Hair Cells .....	140
<b>Article 5:</b> Clarin-1 as An Essential Organizer of the Auditory Hair Cell Ribbon Synapses. ....	155
<b>Discussion</b> .....	200
1. L'organisation spatiale des canaux calciques au ruban .....	201
2. Les CCI expriment différentes isoformes du canal Cav1.3 .....	204
3. Régulation des canaux Cav1.3 par la libération des protons lors de l'exocytose .....	206
4. Un processus de fusion uni ou multi-vésiculaire au niveau des zones actives synaptiques des CCI ?.....	208
4.1 L'otoférine synchronise-t-elle la fusion multi-vésiculaire ? .....	208
4.2 MVR ou UVR: Avantages et inconvénients pour les CCI .....	208
4.3 La dépendance calcique de l'amplitude des EPSCs.....	210
5. Rôle de l'actine dans le trafic vésiculaire et l'organisation spatiale des canaux CaV1.3 ...	211
6. Pression hydrostatique intracellulaire et actine-F .....	211
7. Rôle de l'ATP intracellulaire dans l'exocytose des CCI .....	213
8. La clarine 1 et l'organisation des canaux calciques Cav1.3 .....	215
9. La clarine 1: maintien des fibres afférentes post-synaptiques.....	216
<b>Conclusions sur l'organisation des zones actives des cellules ciliées</b> .....	216
<b>Perspectives</b> .....	218
<b>Références Bibliographiques</b> .....	220

# Liste des Figures

**Figure 1:** Propagation et caractéristiques biophysiques de l'onde sonore

**Figure 2:** Schéma général des différentes parties de l'oreille et de la chaîne tympano-ossiculaire logée dans l'oreille moyenne

**Figure 3:** Vue détaillée de l'oreille interne composée par le vestibule et la cochlée

**Figure 4:** Vue détaillée de l'inférieur d'une cochlée

**Figure 5:** Epithéliums ampullaires et utriculaire participant à la formation du vestibule observés en imagerie confocale

**Figure 6:** Vue détaillée de l'organe de Corti et de l'épithélium utriculaire

**Figure 7:** Morphologie et organisation baso-latérale d'une CCE

**Figure 8:** Morphologie et organisation baso-latérale d'une CCI

**Figure 9:** Représentation simplifiée de l'organisation moléculaire des stéréociles des cellules sensorielles auditives

**Figure 10:** Comparaison d'une zone active d'une CCI et d'un photorécepteur

**Figure 11:** Représentation schématique des exons codant les protéines CtPB2, CtBP2-s et Ribeye

**Figure 12:** Tonotopie cochléaire et sélectivité fréquentielle

**Figure 13:** Enregistrement unitaire d'une fibre afférente chez la souris

**Figure 14:** Enregistrement d'un potentiel d'action composite (PAC) chez la souris

**Figure 15:** Exemple d'enregistrement des PAEs chez la souris

**Figure 16:** Terminaison nerveuse d'un bâtonnet chez une souris

**Figure 17:** Terminaison nerveuse d'un cône chez l'Homme

**Figure 18:** Transmission synaptique au niveau des synapses à ruban des CCI

**Figure 19:** Machinerie moléculaire impliquée dans le contrôle de l'exocytose des synapses neuronales du système nerveux central

**Figure 20:** La machinerie de l'exocytose synaptique des synapses à ruban

**Figure 21:** Mécanisme de chargement des vésicules pré-synaptiques en glutamate

**Figure 22:** Fusion multi-vésiculaire (MVR)- ou fusion uni-vésiculaire (UVR) ?

**Figure 23:** Les synaptotagmines et les ferlines



**Figure 24:** L'otoferline dans l'exocytose synaptique des CCI

**Figure 25:** Représentation schématique du canal calcique

**Figure 26:** Isoformes courtes et longues des canaux calciques Cav1.3

**Figure 27:** Hypothèses de configuration en microdomaine et nanodomaine des canaux calciques dans les zones actives des cellules sensorielles de l'oreille interne

**Figure 28:** Organisation des canaux calciques au niveau des zones actives des CCI et des CCU-I

**Figure 29:** Activités électriques évoquées des fibres afférentes auditives enregistrées *in vivo*, chez la souris

**Figure 30:** Modèle proposant le rôle des canaux Cav1.3 et des protons dans l'adaptation de l'activité des fibres afférentes du nerf auditif

**Figure 31:** La  $Ca^{2+}$  dépendance de la fusion vésiculaire synchrone et asynchrone

**Figure 32:** L'exocytose évoque des réponses mécaniques dans les CCI

**Figure 33:** Rôle de l'ATP et de la kinésine dans l'exocytose des CCI

**Figure 34:** Schéma récapitulatif de l'organisation d'une zone active de cellule ciliée interne

# Liste des Abréviations

**AAV:** Adeno Associated Virus  
**ABR :** Auditory Brainstem Response  
**ACTIN-F:** Actine Filamenteuse  
**AMPA:**  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid  
**AMPA:** Récepteurs AMPA  
**ARN:** Acide Ribonucléique  
**ATP<sub>γ</sub>S:** Adenosine 5'-[ $\gamma$ -thio] TriPhosphate  
**BAPTA:** 1, 2-bis o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid  
**Cav1.3<sub>42L</sub>:** isoforme 42 long du canal Cav1.3  
**Cav1.3<sub>44</sub>:** isoforme du canal Cav1.3 délétée de l'exon 44  
**Cav1.3<sub>43S</sub>:** isoforme 43 court (« Short » en anglais) du canal Cav1.3  
**Cav1.3<sub>42A</sub>:** isoforme du canal Cav1.3 ayant intégrée l'exon 42A  
**CaBPs:** Calcium Binding Proteins  
**CAE:** Conduit Auditif Externe  
**CCE:** Cellules Ciliées Externes  
**CCIs:** Cellules Ciliées Internes  
**CCU-I:** Cellules Ciliées Utriculaires de type I  
**CICR:** Calcium- Induced Calcium Release  
**CTD:** C-Terminal Domain  
**CTM:** C Terminal Modulatory  
**dB:** Décibel  
**DCRD:** Distal Carboxy terminal Regulatory Domain  
**EGTA:** Ethylene Glycol Tetraacetic Acid  
**EPSCs:** Excitatory Post Synaptic Currents  
**FRAP:** Fluorescence Recovery After Photobleaching  
**GFP:** Green Fluorescent Protein  
**GluR:** Récepteur glutamatergique  
**GMPc:** Guanosine MonoPhosphate cyclique  
**GTP:** Guanosine TriPhosphate  
**HEK:** Human Embryonic Kidney  
**HVA:** High Voltage Activated  
**ICaTB:** Ca<sup>2+</sup> current Transient Block  
**IDV:** Inactivation Dépendante du Voltage  
**IDC:** Inactivation Dépendante du Calcium  
**LVA:** Low Voltage Activated  
**MB:** Membrane Basilaire  
**Munc13:** Mammalian UnCoordinated 13  
**Munc 18:** Mammalian UnCoordinated 18  
**MVR:** Multi-Vesicular Release  
**NMDA:** N-methyl-D-aspartate  
**OAE:** Oto-Emission Acoustique  
**OGB-2:** Oregon Green Bapta-2  
**OMS:** Organisation Mondiale de la Santé  
**PAC :** Potentiel d'Action Composite  
**PAE:** Potentiel Auditif Evoqué  
**PCRD:** Proximal Carboxy terminal Regulatory Domain  
**PMCA:** Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase  
**RRP:** Readily Releasable Pool  
**SERCA:** Sarco Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase  
**SNAP 25:** Synaptosomal-associated protein 25  
**SNARE:** Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor

**SPL:** Sound Pressure Level  
**SRP:** Slowly Releasable Pool  
**STED:** Stimulated Emission Depletion  
**UVR:** Uni-Vesicular Release  
**VAMP:** Vesicle-Associated Membrane Protein  
**V-ATPase:** Pompe à proton Vésiculaire  
**V-GLUT:** Transporteur vésiculaire du glutamate  
**ZAs:** Zones Actives

# **Publications Scientifiques**

**Articles scientifiques:**

- 1) **Vincent PF**, Bouleau Y, Safieddine S, Petit C, Dulon D (2014) Exocytotic machineries of vestibular type I and cochlear ribbon synapses display similar intrinsic otoferlin-dependent Ca<sup>2+</sup> sensitivity but a different coupling to Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurosci* 34: 10853-10869.
- 2) **Vincent PF**, Bouleau Y, Charpentier G, Emptoz A, Safieddine S, Petit C, Dulon D (2015) Transient and sustained exocytosis at the auditory hair cell ribbon synapse involve different Cav1.3 channel isoforms (manuscrit en préparation).
- 3) **Vincent PF**, Cho S, Bouleau Y, Petit C, von Gersdorff H and Dulon D (2015) Transient Block of Ca<sup>2+</sup> Channels by Exocytosed Protons Reveals Otoferlin-Regulated Multivesicular Release at Mammalian Auditory Hair Cell Ribbon Synapses (manuscrit en préparation).
- 4) **Vincent PF**, Bouleau Y, Petit C, Dulon D (2015) A Synaptic F-Actin Network Controls Otoferlin-dependent exocytosis in auditory inner hair cells. *Elife* 2015 Nov 14;4. pii: e10988. doi: 10.7554/eLife.10988
- 5) Dulon D, Papal S, Cortese M, Emptoz A, **Vincent PF**, Bouleau Y, Safieddine S, Avan P, El-Amraoui A, Petit C (2015) Clarin-1 is an essential structural and functional organizer of the auditory hair cell ribbon synapses (manuscrit en préparation).

**Communications à des congrès scientifiques**

- 1) **Vincent PF**, Bouleau Y, Safieddine S, Petit C, Dulon D (2013) Calcium-sensitivity and otoferlin-dependence of synaptic exocytosis in vestibular and auditory hair cells” Journée scientifique de l’institut Pasteur, Dreux, France.
- 2) **Vincent PF**, Bouleau Y, Safieddine S, Petit C, Dulon D (2013) Probing the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of otoferlin-dependent exocytosis in inner ear hair cells.” The 9<sup>th</sup> Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference, Stanford, CA.
- 3) **Vincent PF**, Bouleau Y, Safieddine S, Petit C, Dulon D (2013) Probing the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of otoferlin-dependent exocytosis in inner ear hair cells.” The Ribbon Synapses Symposium, Göttingen, Germany.
- 4) **Vincent PF**, Bouleau Y, Safieddine S, Petit C, Dulon D (2014) Ca<sup>2+</sup> sensitivity of otoferlin-dependent exocytosis at cochlear and vestibular hair cell ribbon synapses.” Association for Research in Otolaryngology (ARO) meeting at San Diego, CA.
- 5) Boutet de Monvel J, Dulon D, Petit C, Nouaille S, Bouleau Y, **Vincent PF**, Mallet A, Sartori Rupp A (2014) Sustained Vesicle Release at the IHC Ribbon Synapse Depends on the Intravesicular Domain of Otoferlin Association for Research in Otolaryngology (ARO) meeting at San Diego, CA.
- 6) **Vincent PF**, Bouleau Y, Safieddine S, Petit C, Dulon D (2014) Exocytosis at vestibular Type I Caliceal and Cochlear bouton ribbon synapses displays similar intrinsic otoferlin-dependent Ca<sup>2+</sup> sensitivity but a different coupling with Ca<sup>2+</sup> channels. Journée de l’école doctorale à Arcachon.

- 7) **Vincent PF**, Bouleau Y, Dulon D (2015) A differential sensitivity to nifedipine reveals the implication of two pools of Ca<sup>2+</sup> channels in IHC exocytosis: a nifedipine-insensitive pool triggering the RRP and a nifedipine-sensitive pool controlling vesicular recruitment to the ribbon. Association for Research in Otolaryngology (ARO) meeting, Baltimore, MD.
- 8) Dulon D, Papal S, Cortese M, Emptoz A, **Vincent PF**, Tlili A, Bouleau Y, Safieddine S, Avan P, El-Amraoui A, Petit C (2015) Cellular and Molecular Mechanisms of Hearing Loss in Type III Usher Syndrome. Association for Research in Otolaryngology (ARO) meeting, Baltimore, MD.
- 9) **Vincent PF**, Bouleau Y, Charpentier G, Emptoz A, Safieddine S, Petit C, Dulon D (2015) Transient and sustained exocytosis involve different Cav1.3 channel isoforms in auditory hair cells. Journée de l'école doctorale à Arcachon.
- 10) **Vincent PF**, Bouleau Y, Charpentier G, Emptoz A, Safieddine S, Petit C, Dulon D (2015) Transient and sustained exocytosis involve different Cav1.3 channel isoforms in auditory hair cells. 12<sup>ème</sup> congrès de la société des neurosciences.
- 11) **Vincent PF**, Bouleau Y, Charpentier G, Emptoz A, Safieddine S, Petit C, Dulon D (2015) Transient and sustained exocytosis at the auditory hair cell ribbon synapse involve different Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channel isoforms. The Ribbon Synapses Symposium, Göttingen, Germany.

# **Introduction**



# 1. Généralités

## 1.1 Le signal acoustique

Le signal acoustique ou « son » est une perturbation de l'état d'équilibre des particules composant un milieu, qu'il soit liquidien ou aérien, et se propageant longitudinalement dans ce même milieu. Le son se caractérise par trois principaux paramètres, sa durée exprimée en seconde (s), sa fréquence exprimée en hertz (Hz) et son intensité exprimée en décibels SPL (dB SPL, Sound Pressure Level; **Fig. 1**).

- **La durée de l'onde sonore** est directement reliée au temps nécessaire aux particules entrées en vibration pour rejoindre leur état d'équilibre.
- **La fréquence de l'onde sonore** représente le nombre de vibrations par unité de temps. Plus la fréquence sonore est élevée plus le son est perçu comme aigu et inversement pour un son grave. La gamme fréquentielle perçue par l'oreille humaine s'étend de 20 Hz (sons graves) à 20 kHz (sons aigus).
- **L'intensité sonore** représente l'amplitude des vibrations sonores. Plus cette amplitude est élevée plus l'intensité sonore est forte. L'oreille humaine est capable de percevoir des sons allant de 0 à 120 dB SPL. Cependant pour des sons équivalents ou supérieurs 100-110 dB SPL, représentant le seuil de douleur, des dommages au niveau de l'oreille interne commencent à apparaître.

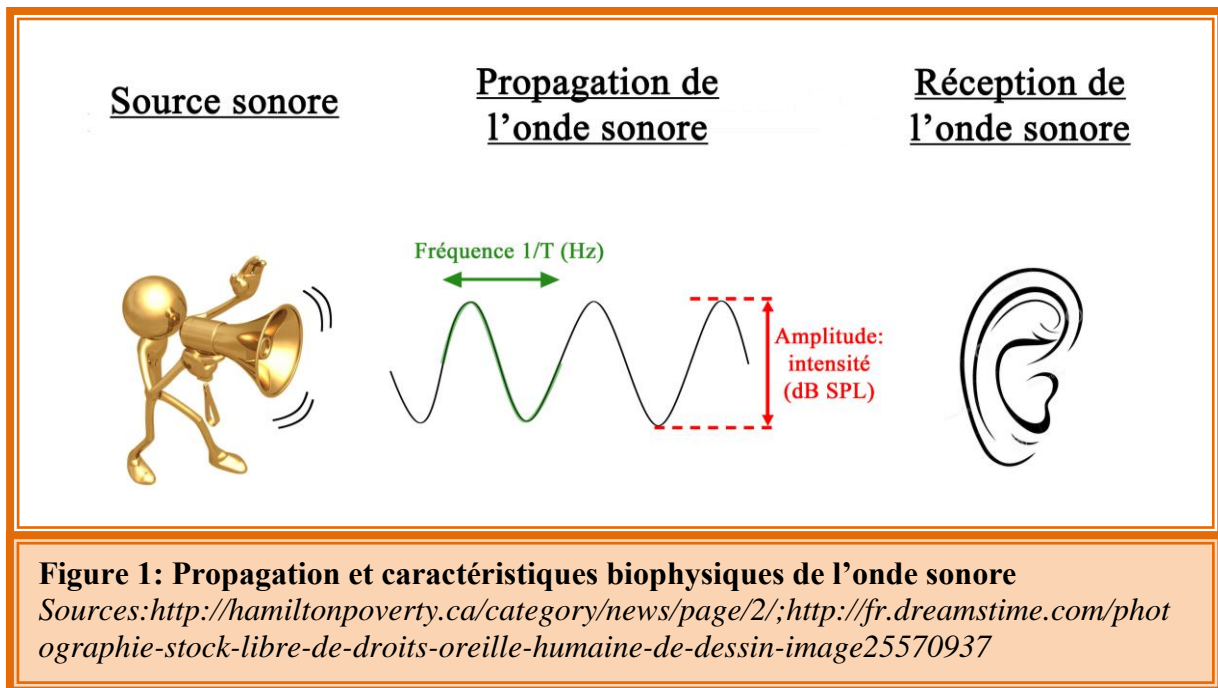
### Que représente l'unité de mesure dB SPL ?

L'unité de mesure *dB SPL* a été établie pour représenter la plus faible intensité sonore que l'oreille humaine peut percevoir pour une fréquence de 1kHz. Elle est calculée en utilisant la formule suivante:

$$X_{dB SPL} = 20 \log_{10} \frac{P}{P_0}$$

Elle correspond au rapport de la pression acoustique test ( $P$ : exprimée en Pascal ou en  $N/m^2$ ) sur la pression acoustique de référence ( $P_0$ ) qui varie selon le milieu dans lequel l'onde sonore se propage. Dans l'air, la pression acoustique de référence  $P_0$  correspond à 20  $\mu Pa$  ou 20  $\mu N/m^2$ . Ainsi un son d'une pression acoustique de 20  $\mu Pa$  équivalant à une intensité de 0 dB SPL, est la plus faible variation de pression que l'oreille humaine est capable de percevoir.

Le signal acoustique est perçu par les individus grâce à l'ouïe. L'audition ne peut se résumer qu'à la simple perception des stimulations sonores extérieures. En effet, elle est indispensable pour l'apprentissage de la parole, l'interaction et la communication avec l'environnement, l'identification et la localisation de dangers potentiels avant même leur perception visuelle. Ce dernier point conditionne notamment la survie d'une espèce dans un environnement hostile.



**Figure 1: Propagation et caractéristiques biophysiques de l'onde sonore**

Sources: <http://hamiltonpoverty.ca/category/news/page/2/>; <http://fr.dreamstime.com/photographie-stock-libre-de-droits-oreille-humaine-de-dessin-image25570937>

## 1.2 Pathologies de l'oreille interne et intérêt de la recherche

### a. Epidémiologie

Ces dernières années, la prise en charge des personnes souffrant de troubles auditifs n'a fait qu'augmenter. De plus la moyenne d'âge des personnes souffrant de surdités légères ou profondes va en diminuant. En effet, il est important de prendre conscience que l'oreille est en permanence soumise à des stimulations sonores plus ou moins agressives tout au long de la vie d'un individu. En plus des bruits extérieurs, certains comportements sociaux comme l'écoute de baladeurs à de très fortes intensités, les discothèques et les concerts, font que de plus en plus de surdités apparaissent précocement chez les jeunes adultes reflétant un enjeu majeur en terme de santé publique. A l'heure actuelle, on estime à environ 360 millions, le nombre de personne souffrant de surdités dans le monde (source OMS). En France, le nombre de personnes sourdes ou malentendantes est estimé à 5 millions dont environ 500 000 âgées de moins de 18 ans. Le dépistage précoce de la surdité chez l'enfant est important pour prévenir les problèmes de développement de l'organe auditif et des relais centraux, les problèmes d'acquisition du langage et d'interaction sociale pouvant être engendrés par ces déficits auditifs.

La surdité (ou hypoacousie) est définie comme une baisse de l'acuité auditive pouvant être d'origine génétique et/ou acquise. Celles-ci sont classées en deux sous catégories:

- Les surdités de transmission impliquant l'oreille externe (pavillon et conduit auditif) et/ou l'oreille moyenne (tympan et chaîne des osselets).
- Les surdités neurosensorielles (ou de perception) ayant principalement pour origine un dysfonctionnement de l'oreille interne (la cochlée) et plus particulièrement les cellules ciliées sensorielles ou le nerf auditif.

Ce sont à la fois les paramètres génétiques et environnementaux qui vont conditionner le vieillissement de l'appareil auditif. La presbyacousie se définit comme le vieillissement normal et progressif de l'appareil auditif entraînant une diminution de l'acuité auditive pour certaines fréquences (fréquences sonores supérieures à 4 kHz). Contrairement à de nombreux

types cellulaires dans notre organisme, les cellules ciliées sensorielles auditives de l'Homme et des mammifères en général, sont incapables de se diviser et de se renouveler. Autrement dit, chaque individu naît avec un capital de cellules ciliées qu'il est nécessaire de protéger.

#### *b. Les surdités neurosensorielles*

Un des premiers tests auditifs effectués à la naissance est celui de la mesure des produits de distorsion des otoémissions acoustiques (OEA), reflétant l'activité mécanique active de la cochlée et son pouvoir d'amplification. Lorsque ce test se révèle négatif, ce dernier devient un candidat potentiel pour l'implant cochléaire qui stimulera directement les fibres nerveuses. Cet implant consiste en un processeur qui, recevant l'onde sonore via un microphone, permet sa transduction en un signal électrique qui est ensuite envoyé jusqu'à une série d'électrodes directement connectées sur les fibres afférentes du nerf auditif permettant leur stimulation.

Cependant, il apparaît dans certains cas, que ces tests fonctionnels ne permettent pas toujours d'établir un diagnostic correct. C'est par exemple le cas de la surdité autosomique récessive DFNB9. Celle-ci est liée à des mutations sur la protéine otoferline, une protéine impliquée dans la transmission synaptique des cellules ciliées internes impliquées dans la transduction du signal acoustique. Les OEA sont normaux mais l'enfant présente une surdité profonde. Les médecins considèrent alors que les fibres nerveuses sont non fonctionnelles, et donc que l'implant cochléaire n'est pas envisageable. Les études portant sur le fonctionnement des cellules sensorielles cochléaires et vestibulaires ont permis de mieux comprendre comment celles-ci sont capables de traiter les signaux qu'elles reçoivent. Par exemple, l'étude sur des modèles murins n'exprimant plus la protéine otoferline, a permis d'établir que la surdité observée est liée à un défaut d'exocytose au niveau des cellules ciliées internes (Roux *et al.*, 2006). Ces résultats montrent donc que les enfants atteints de la surdité DFNB9 sont de bons candidats pour la pose d'un implant cochléaire.

#### *c. Les antibiotiques aminoglycosidiques*

De nombreuses infections d'origines bactériennes, nécessitent la prescription d'antibiotiques aminoglycosidiques. Cependant de nombreuses études ont montré que certains de ces antibiotiques ont un effet délétère sur les cellules sensorielles de l'oreille interne aussi bien cochléaires que vestibulaires, en induisant la mort cellulaire par des mécanismes toxiques. Les antibiotiques aminoglycosides sont connus pour cibler les ribosomes bactériens empêchant la synthèse protéique. De nombreuses recherches ont mis en évidence plusieurs mécanismes moléculaires, par lesquels ces antibiotiques agissent au niveau de l'oreille interne. A partir du compartiment sanguin, une des voies d'entrée des antibiotiques est la strie vasculaire. Cette dernière est indispensable à la genèse et au maintien du potentiel électrochimique endocochléaire par l'action des pompes ioniques dépendantes de l'ATP. En ciblant les ARN ribosomiaux des mitochondries, les aminosides préviennent la synthèse d'ATP nécessaire au fonctionnement cellulaire et notamment au fonctionnement des pompes Na/K ATPase. L'arrêt de leur fonctionnement, entraîne une chute du potentiel endocochléaire à l'origine des surdités progressives chez l'Homme. En plus de toucher la strie vasculaire, les antibiotiques aminoglycosidiques pénètrent dans les cellules ciliées, en passant par les canaux de mécano-transduction de la touffe ciliaire, où ils bloquent la synthèse protéique. Ils entraînent ainsi la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et induisent la mort cellulaire par l'activation de la voie des caspases. Pour répondre à ce problème, certaines stratégies ont été mises en place pour continuer à utiliser ces traitements efficaces tout en protégeant les cellules sensorielles (voir revue: Huth *et al.*, 2011). Les deux grandes stratégies mises en place sont: 1) le blocage de la voie des caspases en bloquant certains partenaires protéiques et 2) la neutralisation des ROS par l'utilisation de chélateurs ioniques tels que les antioxydants.

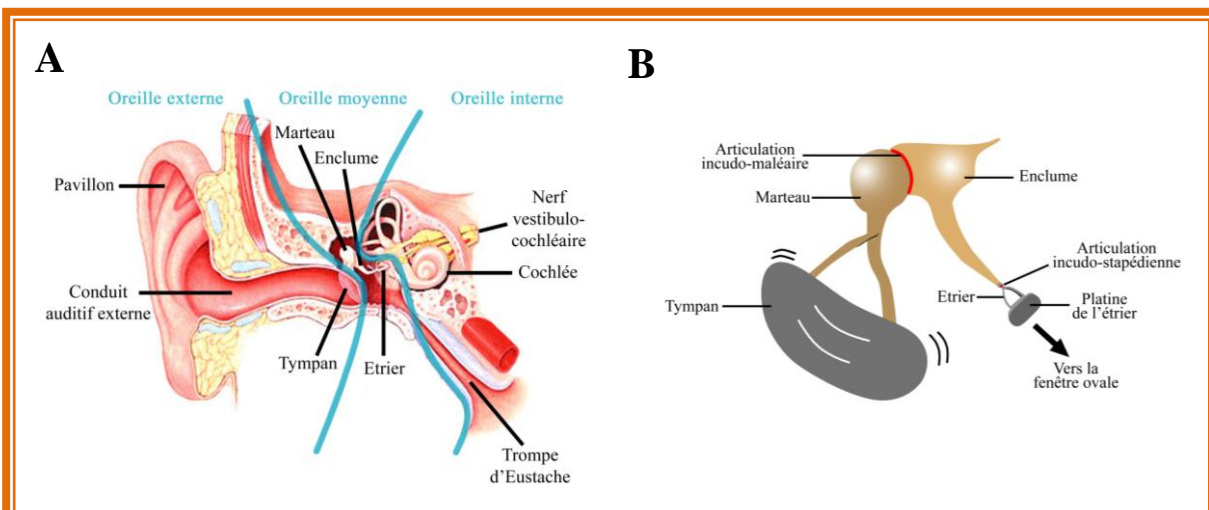
Il apparaît donc nécessaire de comprendre le fonctionnement et les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la perception, la transmission et la transduction du signal acoustique par l'oreille.

## 2. L'organisation générale de l'oreille

L'oreille est l'organe qui nous permet de percevoir les ondes sonores et de traduire ces signaux mécaniques en signaux électriques, capables d'être décodés et interprétés par les centres nerveux supérieurs. L'oreille humaine, comme celle des rongeurs, se divise en trois parties distinctes, l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne, chacune jouant un rôle particulier dans le traitement de l'information sonore.

### 2.1 L'oreille externe

L'oreille externe, comprenant le pavillon et le conduit auditif externe (CAE; **Fig. 2A**), constitue la partie visible de l'oreille. Le pavillon est cartilagineux et sa forme est propre à chaque individu, comme le sont les empreintes digitales. Le pavillon a pour rôle d'amortir et d'amplifier l'onde sonore avant son entrée dans le CAE, mais aussi de participer à la localisation d'une source sonore dans l'espace. En effet, le retard de détection d'un son entre l'oreille droite et l'oreille gauche, encore appelé différence de temps interaurale, permet au cerveau d'estimer la position d'une source sonore dans l'espace, pour des fréquences inférieures à 1,5 kHz, c'est-à-dire dans les fréquences conversationnelles (0,5 à 2 kHz). Le CAE a une longueur d'environ 23 mm et un diamètre d'environ 7 mm. Il a pour rôle de transmettre l'onde sonore jusqu'à la membrane tympanique représentant la limite physique entre l'oreille externe et moyenne.



**Figure 2: Schéma général des différentes parties de l'oreille et de la chaîne tympano-ossiculaire logée dans l'oreille moyenne (A)** Schéma présentant l'oreille externe constituée par le pavillon et le conduit auditif externe. L'oreille moyenne est représentée par la chaîne tympano-ossiculaire. L'oreille interne est constituée par la cochlée (organe de l'audition) et le vestibule (organe de l'équilibre). **(B)** Vue détaillée de la chaîne tympano-ossiculaire permettant la transmission du signal entre le tympan et la fenêtre ovale de la cochlée.

Source: <http://tpepouvoirmusique.e-monsite.com/pages/partie-1-l-acoustique-musicale/b-deux-oreilles-pour-entendre.htm>

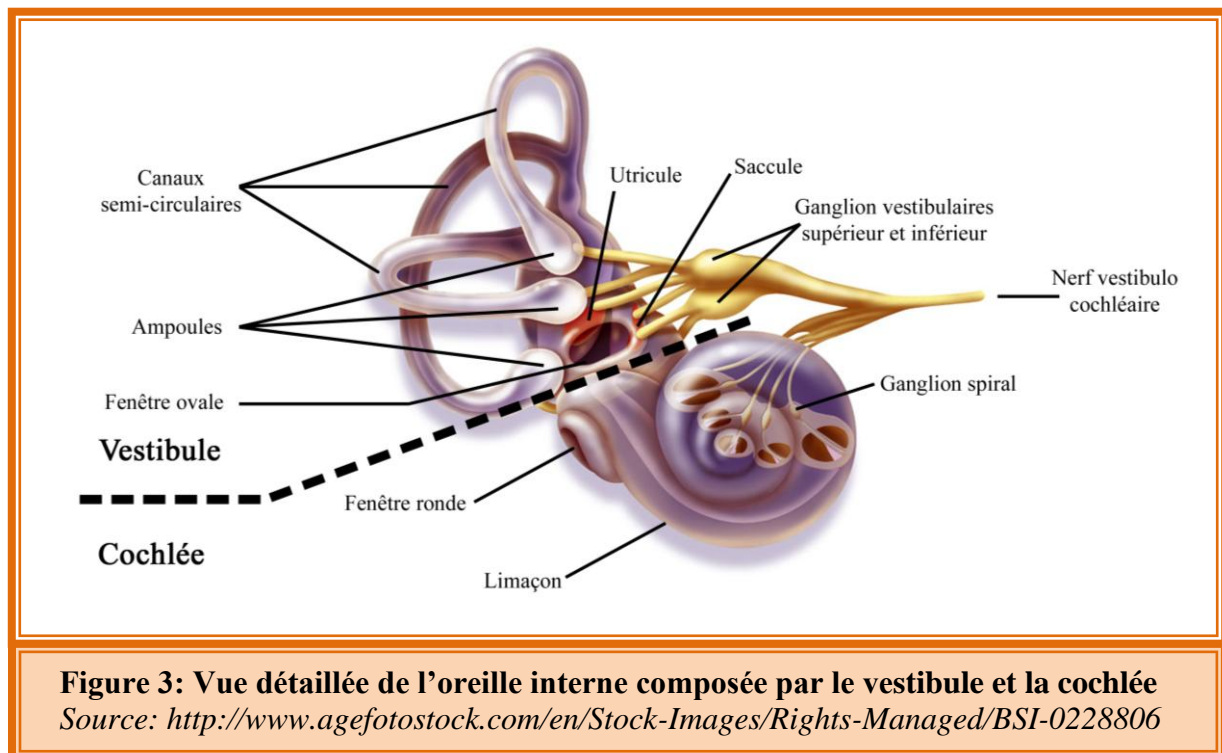
### 2.2 L'oreille moyenne

L'oreille moyenne (ou caisse tympanique) est une cavité remplie d'air dans laquelle se retrouve articulée, par des ligaments, la chaîne des osselets (ou chaîne ossiculaire; **Fig. 2B**). Elle fait suite au tympan, une membrane d'une épaisseur d'environ 0,1 mm et d'un diamètre de 10 mm chez l'Homme. Le tympan réceptionne les vibrations sonores provenant du CAE et

les transmet à la chaîne ossiculaire. Celle-ci est composée des plus petits os du corps humain, les osselets. Ils sont au nombre de trois: le marteau relié au tympan, l'enclume et pour finir, l'étrier, en connexion avec l'oreille interne, via la membrane de fenêtré ovale de la cochlée (**Fig. 2B**). Les vibrations du tympan entraînent un déplacement de la chaîne ossiculaire jusqu'à l'étrier. Il en résulte la stimulation des cellules sensorielles localisées dans l'oreille interne. Le principal rôle de l'oreille moyenne est de convertir le signal sonore aérien en mouvements liquidiens à l'origine des vibrations de la membrane basilaire au niveau de l'oreille interne. L'oreille moyenne est importante pour l'amplification de l'onde sonore et joue aussi le rôle d'adaptateur d'impédance, limitant ainsi la perte d'énergie de l'onde acoustique entre le tympan et la fenêtré ovale de la cochlée. Un rôle important de l'oreille moyenne est de protéger les cellules sensorielles de la cochlée par le réflexe ossiculaire encore appelé réflexe stapédien. Il met en jeu le nerf vestibulo-cochléaire ainsi que le nerf facial. Ce réflexe se met en place en réponse à des sons de fortes intensités (> 80 dB SPL) et de fréquences inférieures à 2 kHz. Cet arc réflexe nécessite la contraction de certains muscles attachés à la chaîne ossiculaire, entraînant une augmentation de sa rigidité et donc limitant le transfert de l'énergie acoustique entre le tympan et l'oreille interne. Néanmoins, ces muscles se caractérisent par leur fatigabilité faisant que leur rôle de protection est extrêmement limité en cas de stimulations agressives répétées. La latence entre l'activation et la mise en place de ce réflexe étant d'environ 10 ms, certains dommages de l'oreille interne ne peuvent être évités.

### 2.3 L'oreille interne

C'est au niveau de l'oreille interne que se trouve l'organe à l'origine de la transduction du signal sonore, la cochlée (ou limaçon). Les cellules sensorielles perçoivent les oscillations de la chaîne tympano-ossiculaire et les traduisent en signaux électriques sous la forme de potentiels d'actions sur les fibres afférentes du nerf auditif. L'oreille interne est composée, en plus de la cochlée, par le vestibule: l'organe de l'équilibre (**Fig. 3**).



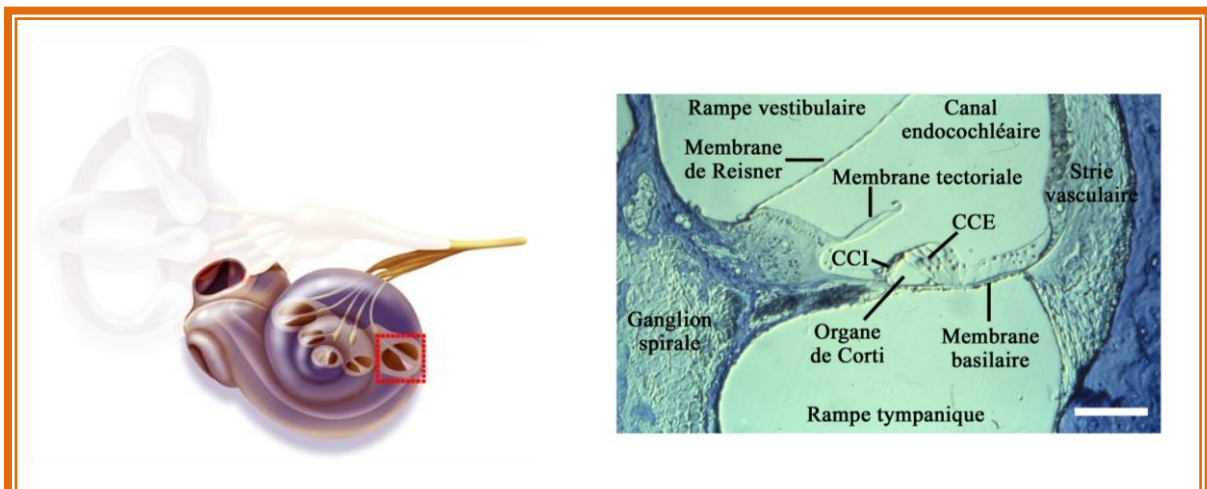
**Figure 3: Vue détaillée de l'oreille interne composée par le vestibule et la cochlée**

Source: <http://www.agefotostock.com/en/Stock-Images/Rights-Managed/BSI-0228806>



### a. La cochlée : organe de l'audition

La cochlée s'apparente à un petit limaçon ayant une taille d'environ 35 mm, lorsqu'elle est déroulée, et dont le nombre de tours de spire varie entre les espèces (**Fig. 3**). Par exemple, chez l'Homme, la cochlée fait deux tours et demi de spire alors que celle du rat en fait trois. La cochlée est composée de trois rampes (ou scala) s'enroulant autour de l'os central (spiral lymbus) de la cochlée depuis la base jusqu'à l'apex de cette dernière (**Fig. 3 et Fig. 4**). La rampe vestibulaire fait suite à la fenêtre ovale et la rampe tympanique s'ouvre sur la fenêtre ronde. Ces deux rampes sont remplies par un milieu liquidien, la périlymphe, dont la composition est proche de celle du liquide céphalo-rachidien. La fenêtre ronde joue le rôle de « soupape » grâce à la membrane flexible qui la recouvre. Cette dernière permet d'éviter une élévation de la pression au sein de la cochlée, due au déplacement de la périlymphe en réponse aux mouvements de la membrane de la fenêtre ovale. Les deux rampes communiquent entre elles au niveau du sommet de la cochlée par l'hélicotrème (**Fig. 12A**). La troisième rampe est la rampe médiane ou canal endocochléaire se situant entre la rampe vestibulaire (au-dessus) et la rampe tympanique (en dessous). L'organe de Corti est l'épithélium sensoriel auditif à l'origine de l'encodage du signal acoustique (**Fig. 4 et Fig. 6A**). Il repose sur la membrane basilaire (**Fig. 12**) représentant la limite inférieure entre le canal endocochléaire et la rampe tympanique. A l'intérieur du canal endocochléaire circule l'endolymphe, dont la composition ionique diffère de celle de la périlymphe par sa forte concentration en potassium ( $K^+$ ; 150 mM) et sa faible concentration en sodium  $Na^+$  ( $Na^+$ ; 1 mM). Cette forte concentration potassique est générée par les pompes Na/K ATPase exprimées dans la membrane des cellules marginales de la strie vasculaire. Ce gradient est en faveur d'une entrée de  $K^+$  dans les cellules sensorielles permettant leur dépolarisation.



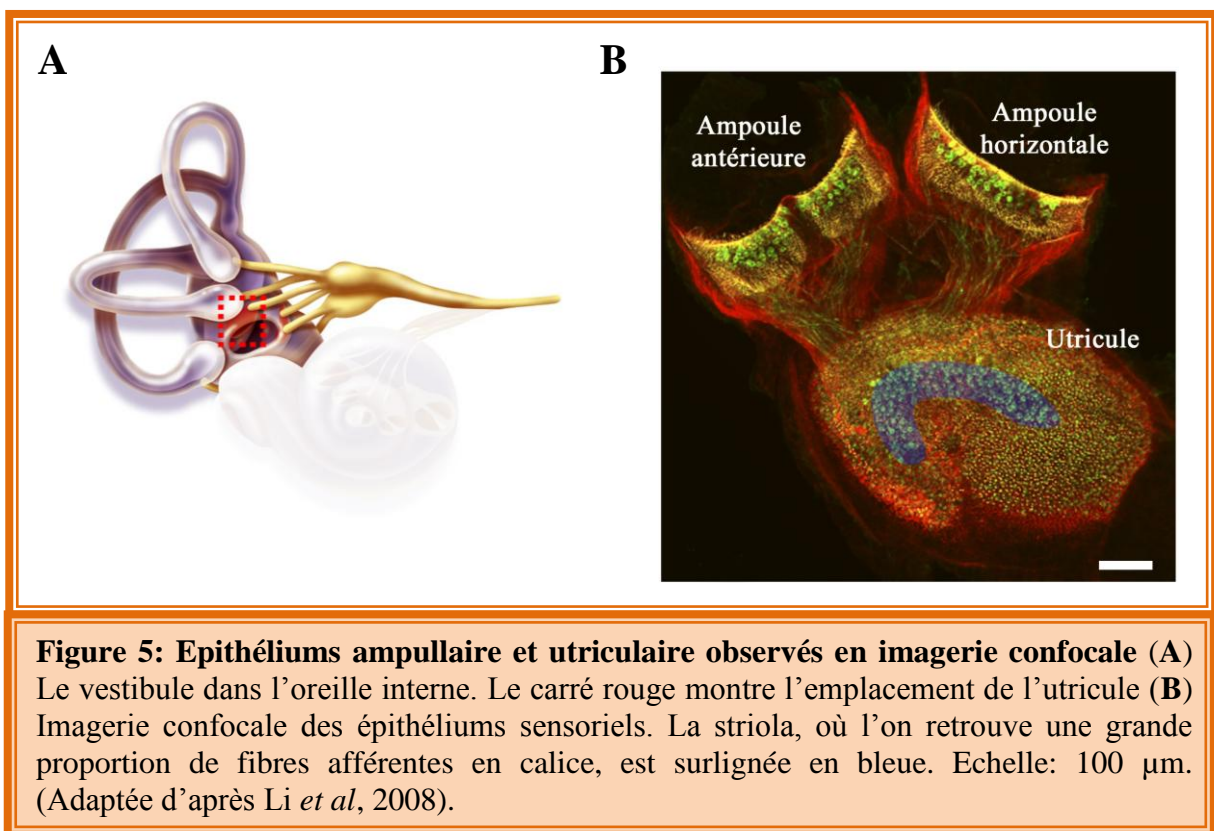
**Figure 4: Vue détaillée de l'intérieur d'une cochlée de cobaye** A droite, coupe histologique transversale au niveau du carré rouge montré à gauche. On distingue les trois rampes enroulées en spirale autour de l'axe central de la cochlée et l'organe de Corti reposant sur la membrane basilaire. Echelle: 100 µm.

Source: image du laboratoire

### b. Le vestibule: organe de l'équilibre

Le vestibule est l'organe de l'équilibre se trouvant à la base de la cochlée (**Fig. 3 et Fig. 5**). Il permet le maintien de la posture, la détection de la position de la tête dans l'espace, et est responsable de la perception des variations de pesanteur. Le vestibule est aussi impliqué dans la détection des accélérations linéaires et angulaires (Eatock and Songer, 2011). Il se compose de plusieurs organes, chacun ayant des fonctions spécifiques.

On note la présence de trois ampoules contenant les cellules sensorielles (épithélium ampullaire ou crista ampullaris) nécessaires à la détection des accélérations angulaires (**Fig. 5B**, deux ampoules représentées). Les ampoules sont reliées entre elles par trois canaux semi-circulaires dans lesquels circule l'endolymphe. Ils sont orientés de manière orthogonale, dans les trois plans de l'espace. Les deux derniers organes constituant le vestibule sont le saccule et l'utricule (**Fig. 5B**) formant les organes otolithiques, en référence aux cristaux de carbonate de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ; otolithes ou otoconies) présents à la surface des cellules sensorielles (**Fig. 6B**). Cet épithélium porte le nom de macula sacculaire pour le saccule et de macula utriculaire pour l'utricule. Ils sont impliqués dans la perception de la gravité et des accélérations linéaires dans le plan horizontal et vertical. En fonction des mouvements de la tête, le déplacement des masses inertielles (tels que les otoconies pour l'utricule et le saccule, ou la cupule pour les crêtes ampullaires) amplifie le mouvement de cisaillement des stéréocils des cellules sensorielles à l'origine de la stimulation des cellules sensorielles permettant la stimulation des fibres afférentes du nerf vestibulaire.





### 3. Les épithéliums sensoriels auditif et vestibulaire

#### a. L'organe de Corti

L'organe de Corti porte ce nom en référence à Alfonso Corti, un anatomiste qui l'a découvert et décrit pour la première fois en 1851. L'organe de Corti est l'épithélium sensoriel auditif à l'origine de l'encodage du signal acoustique en fréquence et en intensité. Ce signal est ensuite traduit en un signal électrique sous la forme de potentiels post-synaptiques excitateurs (EPSCs: Excitatory Post Synaptic Currents) d'amplitudes et de fréquences variables permettant ou non la genèse de potentiels d'action sur le nerf auditif. L'organe de Corti se compose de différents types cellulaires (**Fig. 6A**). Certaines de ces cellules ont un rôle architectural, c'est-à-dire le maintien de l'intégrité de l'épithélium mais aussi le maintien de l'homéostasie ionique. Il s'agit en particulier des cellules de soutien, impliquées dans la recapture du  $K^+$  extrudé par les cellules sensorielles. Le  $K^+$  est ensuite acheminé vers la strie vasculaire permettant de générer le gradient électrochimique de potassium favorable à son entrée dans les cellules ciliées. Les cellules ciliées sensorielles sont les acteurs principaux à l'origine de l'amplification et de l'encodage du signal sonore.

#### b. L'épithélium vestibulaire

L'utricule, le saccule, les ampoules et les canaux semi-circulaires, forment l'organe vestibulaire. L'organisation tissulaire de l'ensemble de ces épithéliums est très similaire. L'épithélium utriculaire se compose de deux grands types cellulaires, les cellules sensorielles responsables de l'encodage du signal à l'image des CCI de l'organe de Corti et autour d'elles on retrouve les cellules de soutien permettant le maintien de l'intégrité tissulaire et l'isolement électrique des cellules sensorielles les unes par rapport aux autres (**Fig. 6B**). Il existe deux types de cellules sensorielles caractérisées en grande partie par leur forme, leur localisation dans l'épithélium, leur vitesse de maturation au cours du développement, la morphologie et la régularité des fréquences de décharge des fibres post-synaptiques les contactant (Eatock and Songer, 2011). L'épithélium utriculaire est subdivisé en deux grandes parties, une partie centrale appelée la striola (**Fig. 5B**, région en bleue) et une partie périphérique appelée extra-striola (**Fig. 5B**; Li *et al.*, 2008; Eatock and Songer, 2011; Songer and Eatock, 2013). Une autre particularité de cet épithélium, aussi valable pour l'épithélium sacculaire, est la présence d'une ligne de polarité qui longe la zone de la striola. De part et d'autre de cette ligne, l'orientation des stéréocils dans la partie apicale des cellules sensorielles est inversée. Ainsi, lors du déplacement des otoconies, suite aux mouvements de la tête, certaines cellules ciliées seront dépolarisées alors que celles situées de l'autre côté de cette ligne seront hyperpolarisées. Il en résultera un équilibre entre des signaux excitateurs (augmentation de la fréquence de décharge des fibres afférentes) et inhibiteurs (diminution de la fréquence de décharge des fibres afférentes) que les centres nerveux supérieurs intégreront pour renseigner précisément la position de la tête dans l'espace.

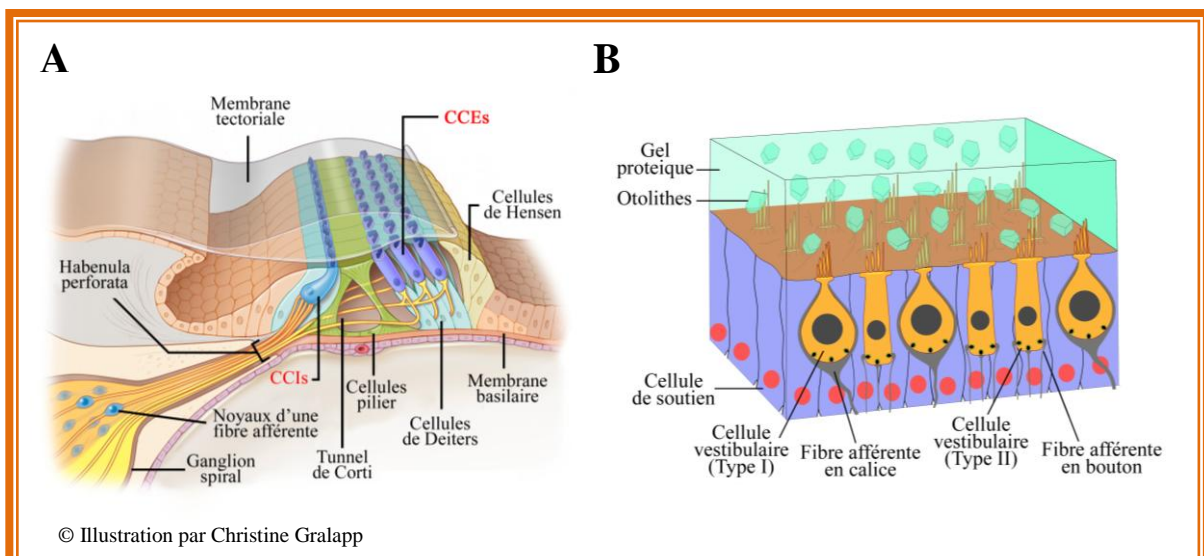
### 3.1 Les cellules ciliées sensorielles

#### a. L'organe de Corti

Au sein de l'organe de Corti, il existe deux types de cellules ciliées sensorielles. Les cellules ciliées internes (CCIs), au nombre de 3500 chez l'Homme (Dallos, 1992, Ashmore, 2008), organisées sur une rangée au niveau de l'axe intérieur de l'organe de Corti. Le deuxième type de cellules sensorielles est constitué par les cellules ciliées externes (CCEs), au nombre de 12000 chez l'Homme, organisées en trois rangées sur l'axe extérieur de l'organe de Corti (**Fig. 6A**). Elles sont les actrices principales et indispensables au décryptage et à

l'encodage du signal sonore. Les CCI sont directement impliquées dans la traduction du signal acoustique en signal électrique, alors que les CCEs ont un rôle mécanique permettant d'amplifier les vibrations de la membrane basilaire à des fréquences spécifiques, participant à l'encodage fréquentielle: c'est la tonotopie active (**voir chapitre 4: La membrane basilaire: un résonateur mécanique**). La perte de toutes ou une partie de ces cellules a un impact considérable sur les capacités auditives d'un individu.

Le système auditif présente des mécanismes de protection des cellules ciliées, notamment par un rétro-contrôle via le système efférent médian et latéral. Le système efférent médian limite l'amplification mécanique du signal au niveau des CCEs tandis que le système latéral agit directement sur les boutons des fibres afférents connectées aux CCI (Lieberman *et al.*, 2014). Suite à de nombreuses études dans les années 1980 et 1990, il apparaît que seuls les mammifères sont incapables de générer de nouvelles cellules ciliées alors que d'autres vertébrés non-mammifères, comme les oiseaux (Corwin and Cotanche, 1988; Robertson *et al.*, 1992; Weisleder and Rubel, 1992) et les poissons (Jorgensen, 1991) présentent cette propriété régénérative. Il a aussi été montré que les cellules sensorielles de la papille des amphibiens pouvaient être régénérées (Cristobal *et al.*, 1998). Cette capacité de régénération a été très étudiée chez le poulet après avoir détruit les cellules ciliées de la papille auditive par des doses successives d'antibiotiques aminoglycosidiques ou par l'exposition à des sons de fortes intensités (voir revue: Rubel *et al.*, 2013). Il apparaît ainsi que les cellules de soutien entourant les cellules ciliées serviraient de réservoir de cellules souches pour la genèse de nouvelles cellules ciliées.



**Figure 6: Vue détaillée de l'organe de Corti et de l'épithélium utriculaire.** (A) Schéma des différentes cellules composant l'organe de Corti reposant sur la membrane basilaire. (B) Epithélium utriculaire montrant les cellules de types I et de type II entourées des cellules de soutien. Au dessus de l'épithélium se trouvent les otolithes dans la matrice protéique qui ont pour rôle de déplacer les stéréocils en fonction des mouvements de la tête.

### b. L'utricule

L'utricule se compose d'environ 3000 à 4000 cellules ciliées (Li *et al.*, 2008). L'épithélium utriculaire possède deux types de cellules ciliées sensorielles. Les cellules ciliées utriculaires de type I (CCU-I) et de type II (CCU-II) (Lysakowski and Goldberg, 2008; Lysakowski *et al.*, 2011). Les CCU-I peuvent aussi être subdivisées en deux groupes en fonction de la morphologie de leurs fibres afférentes. Ainsi, on distingue les CCU-I<sub>C</sub>, cellules utriculaires en contact avec des fibres en forme de calice et les CCU-I<sub>D</sub>, des cellules en contact avec des fibres dimorphiques (**voir chapitre 5: Fibres afférentes et efférentes**). Les fibres afférentes ont été très bien caractérisés électrophysiologiquement, montrant la présence de nombreuses conductances potassiques (Chabbert *et al.*, 2001). Les CCU-I présentent une résistance membranaire plus faible, en raison de la présence de la conductance potassique  $G_{K,L}$  active au potentiel de repos (Rusch *et al.*, 1998; Brichta *et al.*, 2002; Bao *et al.*, 2003), le rôle précis de ces deux types cellulaires n'est pas encore clairement défini (Goldberg, 2000).

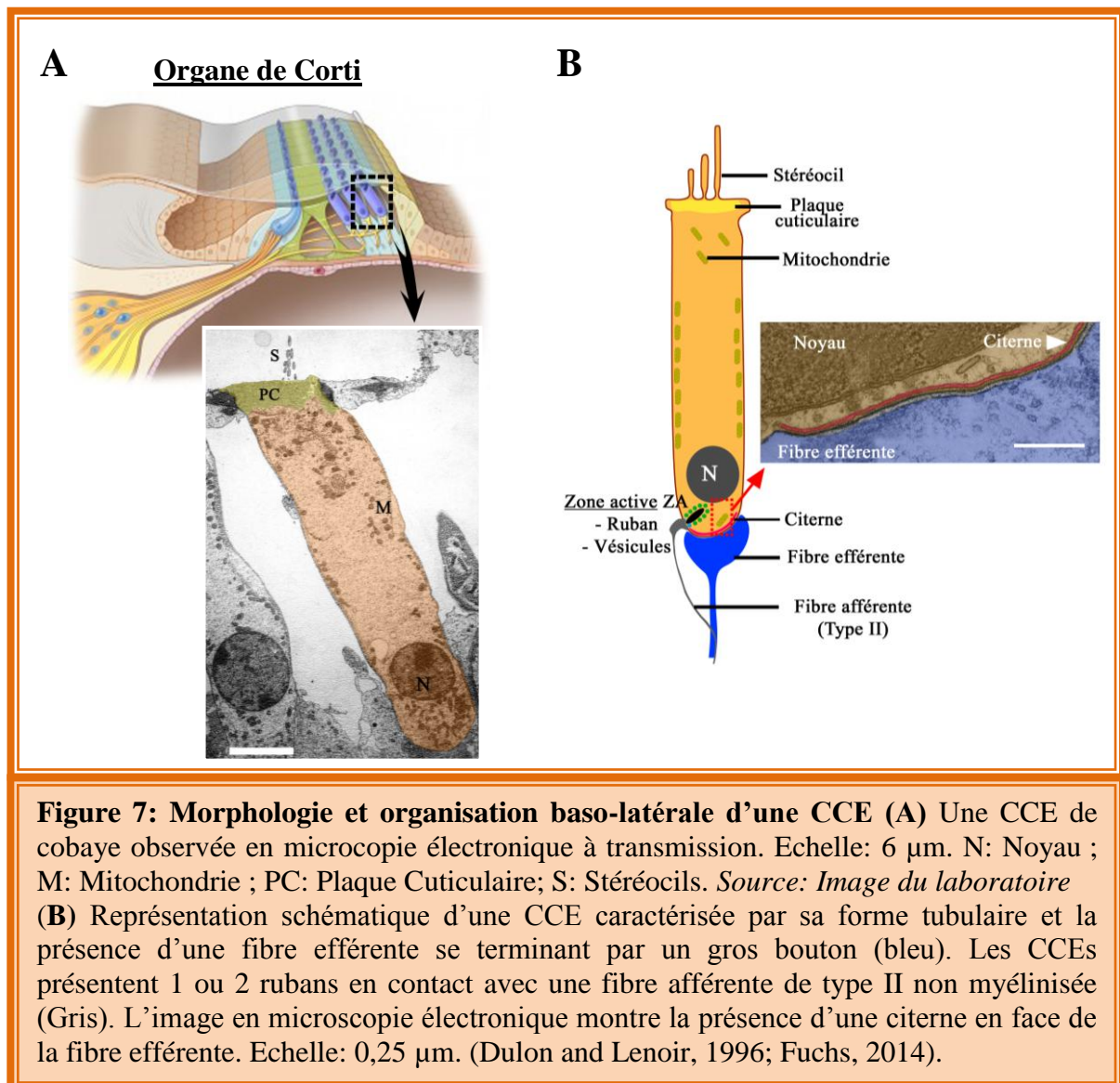
## 3.2 Morphologie des cellules sensorielles

### a. Les cellules sensorielles auditives

#### - Les cellules ciliées externes (CCEs)

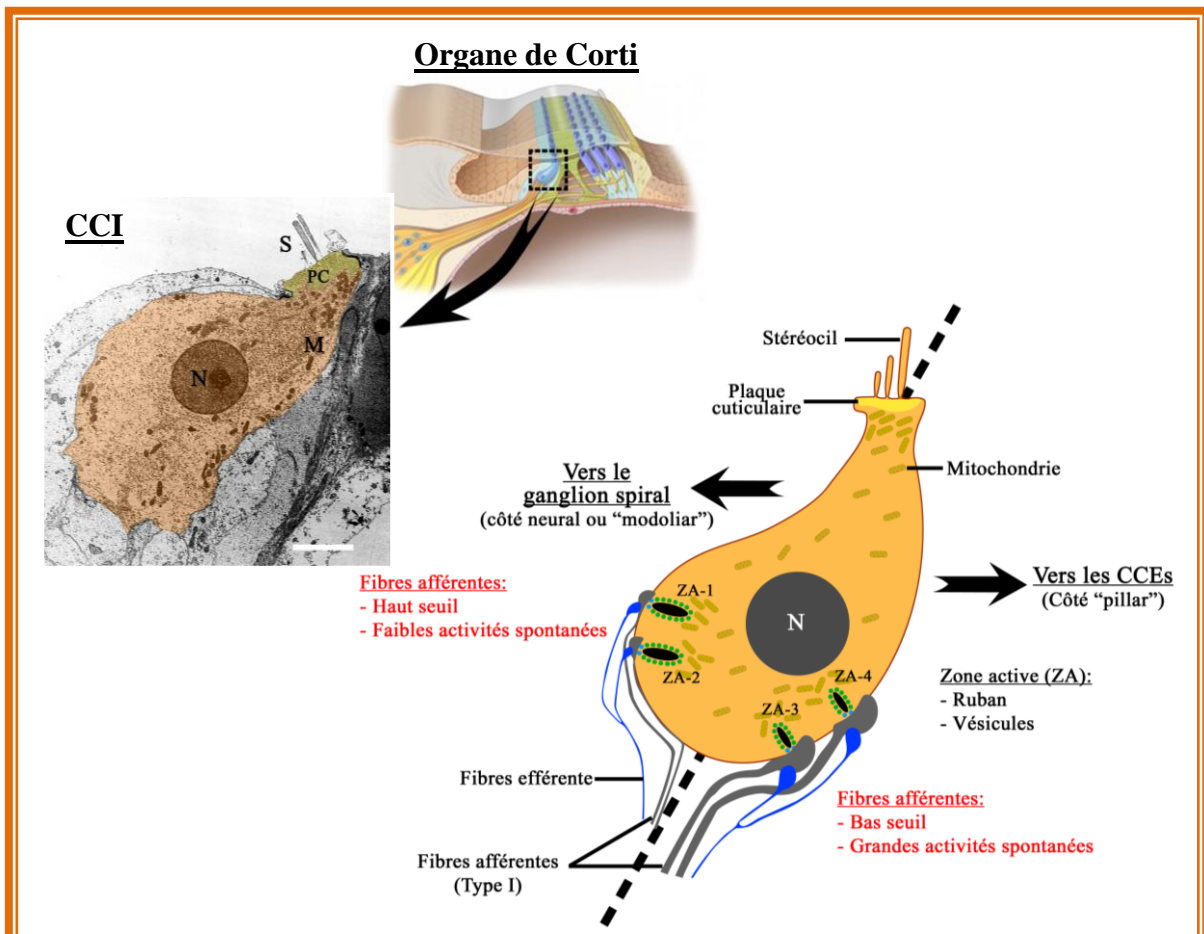
Elles ont une forme tubulaire et une largeur constante d'environ 7  $\mu\text{m}$  de la base vers l'apex de la cochlée. Cependant, leur hauteur augmente le long de la cochlée. Par exemple, chez le cochon d'inde, les CCEs localisées dans la région basale ont une longueur d'environ 25  $\mu\text{m}$ , alors que la longueur de celles situées dans la région apicale peut atteindre jusqu'à 70-75  $\mu\text{m}$  (Housley and Ashmore, 1991). Ces variations de longueur sont retrouvées chez la plupart des espèces de mammifères. Les CCEs se caractérisent aussi par la position très basale de leur noyau ainsi que par la présence de nombreuses mitochondries le long de leur membrane baso-latérale témoignant d'une activité métabolique importante (Hashimoto and Kimura, 1988; Housley and Ashmore, 1991; Dallos, 1992; **Fig. 7**).

Les CCEs expriment dans leur membrane basolatérale la prestine, une protéine piézo-électrique responsable de l'électromotilité (Zheng *et al.*, 2000). Cette protéine des CCEs est à la base de l'amplification des vibrations mécaniques de la membrane basilaire. L'équipe de William Brownell est la première à décrire le changement de taille (élongation/rétractation) des CCEs, lorsque celles-ci sont soumises à un courant électrique alternatif (Brownell, 1985). Ce n'est qu'au début des années 2000 que la prestine a été identifiée et démontrée comme étant le moteur moléculaire à la base de l'amplification cochléaire (Zheng *et al.*, 2000; Liberman *et al.*, 2002). La prestine fait partie de la famille des transporteurs anioniques SLC26, mais ne présente aucune activité de transport à travers la membrane des CCEs (Schachinger and Oliver, 2007). A l'état de repos, les ions chlorures ( $\text{Cl}^-$ ) contenus dans le cytoplasme des CCEs sont fixés sur la prestine, la maintenant dans un état allongé. La dépolarisation membranaire des CCEs libère les ions  $\text{Cl}^-$  fixés à la prestine, déclenchant la rétractation de cette dernière. Cette propriété piézo-électrique de la prestine permet un gain de sensibilité auditif de 40-60 dB (**Fig. 12**).



- Les cellules ciliées internes (CCIs)

La morphologie des CCIs est très différente de celle des CCEs. Elle se caractérise par une forme « d'amphore », c'est-à-dire très évasée à la base et plus étroite dans la partie apicale. (Fig. 8). Bien que l'on puisse comprendre aisément la raison de la morphologie tubulaire des CCEs, la raison de cette différence morphologique entre la partie basale synaptique et la partie apicale des CCIs, reste encore à ce jour inconnue. Les CCIs présentent une hauteur d'environ 30-40  $\mu\text{m}$  et une largeur de 10-15  $\mu\text{m}$  constantes tout le long de l'axe cochléaire. Leur noyau est repoussé dans la partie centrale de la cellule, probablement en raison de la présence des nombreuses zones actives (environ 20 par cellule) s'organisant au pôle baso-latéral des CCIs (Issa and Hudspeth, 1996; Meyer *et al.*, 2009). La microscopie électronique a permis de mettre en évidence, comme pour les CCEs, la présence de nombreuses mitochondries dans le cytoplasme des CCIs et notamment proches des zones actives (Bullen *et al.*, 2015). La présence de ces mitochondries peut être corrélée à la très grande activité d'exocytose des CCIs, nécessitant le chargement continu des vésicules en glutamate par le transporteur vésiculaire glutamatergique 3 (V-GLUT3) et la pompe à proton (V-ATPase). La V-ATPase est ancrée dans la membrane vésiculaire et utilise l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP en ADP pour transporter les protons depuis le cytoplasme des cellules vers l'intérieur des vésicules (voir revue: Beyenbach and Wieczorek, 2006 et Fig. 15).



**Figure 8: Morphologie et organisation baso-latérale d'une CCI** En haut à gauche, une CCI de cobaye observée en microscopie électronique à transmission. Echelle: 2,5  $\mu\text{m}$ . N: Noyau; M: Mitochondrie; PC: Plaque Cuticulaire; S: Stéréocils. *Source : Image du laboratoire.* Les CCIs ont une forme d'« amphore » ou de poire très caractéristique avec un cou très étroit. Le schéma à droite représente l'organisation baso-latérale des ZAs proposée par Charles Liberman (2011). Les fibres afférentes à bas seuil sont du côté « pillar », *i.e.* le côté de la CCI dirigé vers les CCEs, elles coderaient les signaux acoustiques de faibles intensités. Du côté du ganglion spiral, *i.e.* du côté des noyaux des fibres afférentes, ces fibres afférentes sont dites à haut seuil car elles codent les sons de fortes intensités.

### b. Les cellules sensorielles utriculaires

Lorsque l'on compare la morphologie des cellules ciliées utriculaire de type I et de type II, on retrouve le même schéma de comparaison qu'entre les CCIs et CCEs de l'organe de Corti (**Fig. 6B**; Eatock and Songer, 2011). La morphologie des CCU-I est très similaire à celle des CCIs à savoir une forme évasée au niveau de la partie synaptique et une partie apicale plus étroite. Quant aux CCU-II, leur forme est plus comparable à la morphologie des CCEs. La taille des CCU-I et des CCU-II est très similaire et représente la moitié de celle des CCIs.

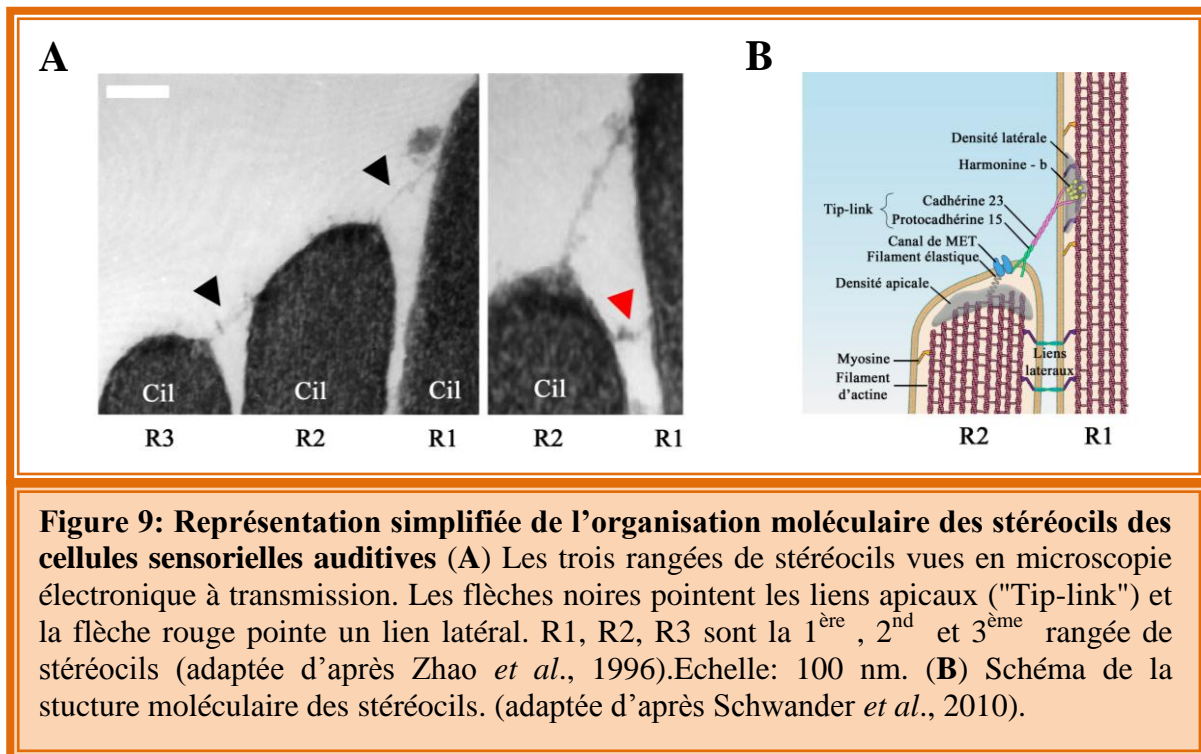
### 3.3 Les cellules sensorielles: des cellules polarisées

#### a. Pôle apical des CCI et CCEs

Les cellules ciliées portent leur nom en raison de la présence à leur pôle apical de structures rigides appelées stéréocils (**Fig. 7, Fig. 8 et Fig. 9**). Les CCI et les CCEs présentent toutes trois rangées de stéréocils mais se distinguent par la manière dont ils sont implantés dans leur plaque cuticulaire, un réseau dense de filaments d'actine. Les stéréocils des CCI se caractérisent par une implantation plutôt linéaire comparée à celle des CCEs formant un « V » ou « W ». Chaque cellule possède environ une centaine de stéréocils organisés sur trois rangées de tailles différentes, de la plus petite du côté « intérieur » de la cellule, c'est-à-dire dirigé vers l'axe central de la cochlée à la plus grande du côté « extérieur », c'est-à-dire du côté de la cellule dirigé vers l'extérieur de la cochlée. La rigidité des stéréocils provient en grande partie de la présence d'un réseau hexagonal très dense de microfilaments d'actine qui s'étend depuis l'apex du cil jusqu'à son point d'insertion dans la plaque cuticulaire (**Fig. 9**; revue: Schwander *et al.*, 2010). Les stéréocils sont une structure complexe composée de nombreuses protéines nécessaires à leur mise en place et à leur organisation. Parmi ces protéines, on retrouve de nombreuses myosines, les protocadhérines, les harmonines ou encore les clarines. Elles sont à l'origine du syndrome d'Usher lorsqu'elles sont mutées ou absentes (Liu *et al.*, 1997; Kremer *et al.*, 2006; Fettiplace and Hackney, 2006; Schwander *et al.*, 2010). Il existe trois types de syndrome d'Usher (USH I à USH III) classés en fonction de la sévérité et l'âge d'apparition des symptômes. Ils se caractérisent par la perte progressive de la vision (cécité), de l'audition et de l'équilibre dans certains cas. L'absence de ces protéines entraîne la dislocation des stéréocils, empêchant les CCEs et les CCI d'amplifier et de traduire le signal acoustique. Parmi, ces nombreuses protéines associées à l'actine, il y a des moteurs dépendant de l'ATP (les myosines par exemple) participant à l'adaptation des courants de mécanotransduction générés par l'influx de  $K^+$  dans ces cellules. Les rangées de stéréocils sont reliées entre elles latéralement, afin de maintenir leur cohésion et la structure de la touffe ciliaire, mais aussi par des liens verticaux que l'on appelle des « tip-links » (**Fig. 9**). C'est à la base de ces « tip-links » que seraient localisés les canaux de mécanotransduction (Beurg *et al.*, 2009).

Depuis plusieurs années, de nombreux laboratoires ont concentré leurs efforts sur l'identification des canaux de mécanotransduction (Fettiplace and Hackney, 2006). Il s'agirait d'un complexe protéique dont les membres ne sont pas encore tous clairement identifiés. Le complexe de mécanotransduction serait composé de canaux TMC1, TMC2 et TMC3 (Kawashima *et al.*, 2011; Beurg *et al.*, 2015). La localisation des canaux de mécanotransduction a été identifiée par des techniques d'imagerie permettant de mesurer l'entrée du  $Ca^{2+}$  au niveau des stéréocils (Beurg *et al.*, 2009). Ainsi nous savons qu'ils sont localisés au niveau de la 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> rangées des stéréocils et uniquement à la partie inférieure des « tip-links ». Cette localisation apparaît identique entre les CCI et les CCEs.





**Figure 9: Représentation simplifiée de l'organisation moléculaire des stéréocils des cellules sensorielles auditives (A)** Les trois rangées de stéréocils vues en microscopie électronique à transmission. Les flèches noires pointent les liens apicaux ("Tip-link") et la flèche rouge pointe un lien latéral. R1, R2, R3 sont la 1<sup>ère</sup>, 2<sup>nd</sup> et 3<sup>ème</sup> rangée de stéréocils (adaptée d'après Zhao *et al.*, 1996). Echelle: 100 nm. **(B)** Schéma de la structure moléculaire des stéréocils. (adaptée d'après Schwander *et al.*, 2010).

#### b. Pôle apical des cellules utriculaires

Contrairement aux cellules ciliées auditives, les CCU-I et CCU-II possèdent 4 rangées de stéréocils implantés dans la plaque cuticulaire à leur pôle apical. Leur taille est plus grande que celle des CCI et CCE et elles possèdent en plus un reliquat embryonnaire appelé kinocil (Schwander *et al.*, 2010). Le kinocil est en contact avec la membrane otoconiale (stimulation des cellules vestibulaires) et permet le développement, l'organisation et la polarisation correcte des stéréocils en fonction de leur localisation par rapport à la ligne de polarité. Alors que le kinocil est présent uniquement pendant la maturation des cellules sensorielles auditives, celui-ci reste en place dans le vestibule. L'organisation moléculaire de la machinerie de mécanotransduction est relativement similaire à celle des CCI et des CCE, même si, comme ces dernières, les partenaires moléculaires formant le complexe de mécanotransduction n'ont pas encore été identifiés (Gillespie and Müller, 2009).

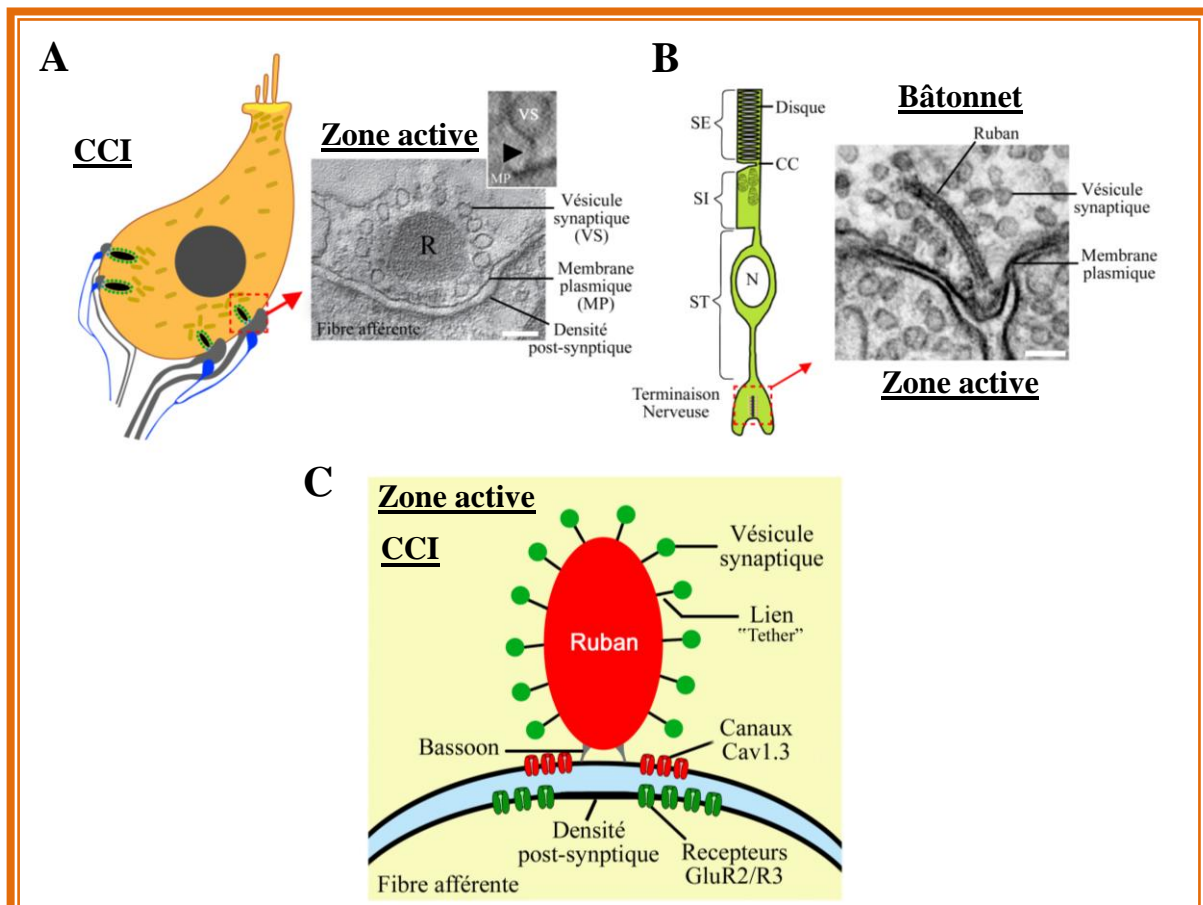
#### c. Pôle baso-latéral et zones actives

##### - Les CCI, CCU-I et CCU-II

C'est au niveau du pôle baso-latéral des CCI et des cellules ciliées utriculaires que se localisent l'ensemble des zones actives (ZAs). A chaque ZA se produit l'exocytose des vésicules contenant le neurotransmetteur, le glutamate. Le nombre de ZAs par CCI varie de la base à l'apex de la cochlée entre 10 et 20 (Meyer *et al.*, 2009). Chez la souris, les CCI présentant le plus grand nombre de ZAs sont localisées dans la région de la cochlée codant des fréquences sonores comprises entre 16 et 32 kHz, correspondant à la gamme fréquentielle la mieux perçue par cette espèce. De même, chez la tortue on retrouve une organisation tonotopique du nombre de ZAs (Schnee *et al.*, 2005). Dans l'utricule, les CCU-I présentent un nombre de ZAs relativement constant (~7-8, Vincent *et al.*, 2014).

Chaque ZA au pôle baso-latéral des CCI et des CCE est caractérisée par la présence d'une structure lamellaire dense aux électrons appelée ruban (**Fig. 10A**; Smith and Sjostrand, 1961; Sobkowicz *et al.*, 1982). Cette structure est aussi présente dans les cellules ciliées

vestibulaires (Wersäll *et al.*, 1967; Favre and Sans, 1979). Sa forme et sa taille varient selon l'espèce considérée, le type cellulaire considéré mais aussi selon la position des rubans, associés aux fibres afférentes à bas ou à haut seuil (Liberman, 1980a). Les fibres à bas seuil font face à de petits rubans tandis que de plus gros rubans font face aux fibres à haut seuil (**Fig. 8**). Chez la souris, le diamètre moyen du ruban est d'environ 300 nm et sa forme est différente entre les CCI et les cellules utriculaires (Wersäll *et al.*, 1967; Favre and Sans, 1979). Ainsi, les CCI expriment des rubans allongés de forme ellipsoïdale (Sobkowicz *et al.*, 1982; Nouvian *et al.*, 2006) alors que ceux des cellules de type I de l'épithélium vestibulaire sont plutôt sphéroïdes (Favre et Sans, 1979; Lysakowski and Goldberg, 1997; Lenzi *et al.*, 1999; Dulon *et al.*, 2009). Il est aussi intéressant d'observer, que la forme et la taille des rubans des photorécepteurs et des cellules bipolaires sont très différentes de celles des cellules ciliées (**Fig. 10B**). En effet, chez la souris, chaque photorécepteur et cellule bipolaire présentent un seul ruban de forme très allongée et plate, pouvant aller jusqu'à 1 µm (Rao-Mirotnik *et al.*, 1995; von Gersdorff *et al.*, 1996; Matthews and Fuchs, 2010; Schmitz, 2014; Al-Amoudi, 2015). Cette différence d'organisation suggère que la forme du ruban joue un rôle important dans le contrôle de l'exocytose. Ce contrôle passerait peut-être par la régulation du flux des vésicules aux ZAs mais aussi via la régulation de l'influx calcique intracellulaire par son rôle de barrière de diffusion (Graydon *et al.*, 2011).



**Figure 10: Comparaison d'une zone active d'une CCI et d'un photorécepteur** Zone active d'une CCI (A, adaptée d'après Pangrisc *et al.*, 2010) et d'un photorécepteur de type bâtonnet (B, adaptée d'après Schmitz, 2014) observées en microscopie électronique. R : ruban; Echelle: 100 nm. On remarque la forme caractéristique, allongée et plate du ruban dans les photorécepteurs avec une organisation similaire des ZAs. SE: Segment Externe; SI: Segment Interne; CC: Cil Connecteur; ST: Segment Terminal; N: Noyau. (C) Représentation schématisée d'une ZA montrant la disposition des canaux Cav1.3 pré-synaptiques et des récepteurs AMPA post-synaptiques.



La protéine majoritaire du ruban est la protéine ribeye. Elle est composée de deux domaines, un domaine A (N-terminal) et un domaine B (C-terminal). Ce dernier est un homologue du facteur de transcription CtBP2s (C-terminal Binding Protein 2s), l'isoforme courte de CtBP2, dans laquelle est épissé le signal de localisation nucléaire (**Fig. 11**; Verger *et al.*, 2006; Sheets *et al.*, 2014). En se servant de peptide reconnaissant une partie de la protéine ribeye, l'organisation dynamique des rubans a pu être observée dans les cellules vivantes (Zenisek *et al.*, 2005). La composition protéique des rubans synaptiques des photorécepteurs a été identifiée par des techniques de purification protéique. L'ensemble des protéines partiellement purifiées a été co-immunoprécipité en utilisant des billes couplées à l'anticorps anti-CtBP2. Les protéines récupérées ont été séparées par électrophorèse puis soumises à une chromatographie en phase liquide associée à la technique de spectrométrie de masse (LC-MS/MS; Kantardzhieva *et al.*, 2012). Parmi l'ensemble des protéines identifiées comme interagissant avec la protéine ribeye (ou CtBP2), on retrouve la protéine bassoon, une protéine d'échafaudage. Dans les cellules ciliées cochléaires et vestibulaires (Khimich *et al.*, 2005) mais aussi dans les photorécepteurs (Dick *et al.*, 2003), cette protéine permet d'ancrer chaque ruban dans la membrane plasmique.

Dans le but d'étudier le rôle du ruban dans la transmission synaptique des cellules sensorielles auditives et visuelles, différents modèles transgéniques dans lesquels l'expression de la protéine bassoon est altérée ont été générés (Dick *et al.*, 2003; Frank *et al.*, 2010; Jing *et al.*, 2013). En absence de la protéine bassoon, la majorité des rubans n'est plus attachée à la membrane plasmique et flotte dans le cytoplasme. L'ensemble de ces études montre une altération de la transmission synaptique en absence de la protéine bassoon. Cette altération est associée à un plus faible nombre de canaux calciques dans les ZAs, un défaut dans la fusion et le ravitaillement vésiculaire (Frank *et al.*, 2010; Jing *et al.*, 2013). De manière surprenante, chez les souris matures (après P12) déficientes pour la protéine otoferline (*Otof*<sup>-/-</sup>), le senseur calcique présumé des CCI, les études en microscopie électronique montrent que plus de 50 % des rubans dégénèrent. Ce résultat suggère un rôle de l'otoferline dans le maintien des rubans à la membrane (Roux *et al.*, 2006) ou bien que l'activité de chaque zone active est importante pour maintenir le ruban à la membrane.

Chez la souris sauvage, les ZAs des cellules sensorielles présentent de nombreuses vésicules synaptiques attachées aux rubans mais aussi des vésicules libres autour de ceux-ci. Les vésicules sont rattachées au ruban et à la membrane plasmique par des liens (« tethers ») dont la composition protéique reste encore à déterminer (**Fig. 10A**; Vogl *et al.*, 2015). Pour des raisons encore inconnues, ces tethers seraient plus longs dans les CCI n'exprimant pas l'otoferline.

Cependant, le rôle précis du ruban dans l'exocytose des cellules sensorielles auditives, vestibulaires et visuelles reste encore inconnu. Différentes hypothèses ont été proposées (Fuchs, 2008, Matthews and Fuchs, 2010; Safieddine *et al.*, 2012):

- Concentration des vésicules pré-synaptiques proches des sites de fusion permettant la formation de « réservoirs » de vésicules compétantes prêtes à fusionner (Lenzi *et al.*, 1999; Parsons and sterling, 2003).
- Remplacement rapide des vésicules ayant fusionnées. Le ruban jouerait le rôle de « tapis roulant » le long duquel les vésicules se déplaceraient jusqu'à la membrane plasmique pour fusionner (Parsons and sterling, 2003).
- Rôle de barrière de diffusion pour le Ca<sup>2+</sup> (Graydon *et al.*, 2011).

- Synchronisation de la fusion vésiculaire au sein de chacune des ZAs (Khimich *et al.*, 2005; Graydon *et al.*, 2011; Jing *et al.*, 2013) permettant la genèse de courants post synaptiques excitateurs d'amplitudes et de formes variables, c'est à dire mono et multiphasiques, reflétant le caractère synchrone de la fusion vésiculaire (Glowatzki and Fuchs, 2002; Grant *et al.*, 2010).
- Organisation et maintien des canaux calciques dans les ZAs (Frank *et al.*, 2010).
- Régulation de la fusion rapide du RRP (Readily Releasable Pool) et du recrutement vésiculaire (Frank *et al.*, 2010; Jing *et al.*, 2013).

C'est au niveau de chacune des ZAs et sous chaque ruban que les canaux calciques de type L dépendants du voltage se distribuent (**Fig. 10C**; Frank *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2014). Les CCI expriment majoritairement l'isoforme Cav1.3 (sous-unité alpha 1D) que l'on retrouve aussi dans les cellules cardiaques (Platzer *et al.*, 2000; Brandt *et al.*, 2003; Brandt *et al.*, 2005). La localisation des canaux calciques varie au cours du développement, avec une distribution plus resserrée dans les ZAs chez les CCI matures (Johnson *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2014). Il a aussi été observé qu'au sein d'une même cellule, les ZAs ne sont pas toutes identiques. En effet, la taille des rubans mais aussi la taille des microdomaines calciques sont différentes (Frank *et al.*, 2009). Une variation de la taille de ces microdomaines peut refléter à la fois un nombre de canaux calciques différent, une agrégation plus ou moins resserrée des canaux calciques entre eux mais aussi un pouvoir différent de tamponnage des ions  $Ca^{2+}$  entre chaque ZA. Ces différences d'homéostasie calcique sous chaque ruban, participent à la formation de ZAs à haut et bas seuil d'activation, observées pour la première fois par Charles Liberman en 1982 chez le chat (Liberman, 1982a). Cette différence de seuils d'activation entre les différentes ZAs permet à chaque CCI de coder le signal sonore sur une large dynamique d'intensité de plus de 100 dB. Sur chacune des ZAs des CCI, marquée par la présence d'un ruban, une seule fibre afférente du nerf auditif vient faire synapse (Liberman, 1980a; Liberman *et al.*, 1990). Les boutons synaptiques de ces fibres afférentes expriment majoritairement des récepteurs AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) de type GluR2 et GluR3 (Matsubara *et al.*, 1996; Liberman *et al.*, 2011). Cette organisation post-synaptique où une fibre afférente intègre l'activité d'un seul ruban est très différente de celle des CCU-I, où chaque cellule est en contact avec une fibre nerveuse afférente en forme de calice intégrant l'activité d'une dizaine de rubans.

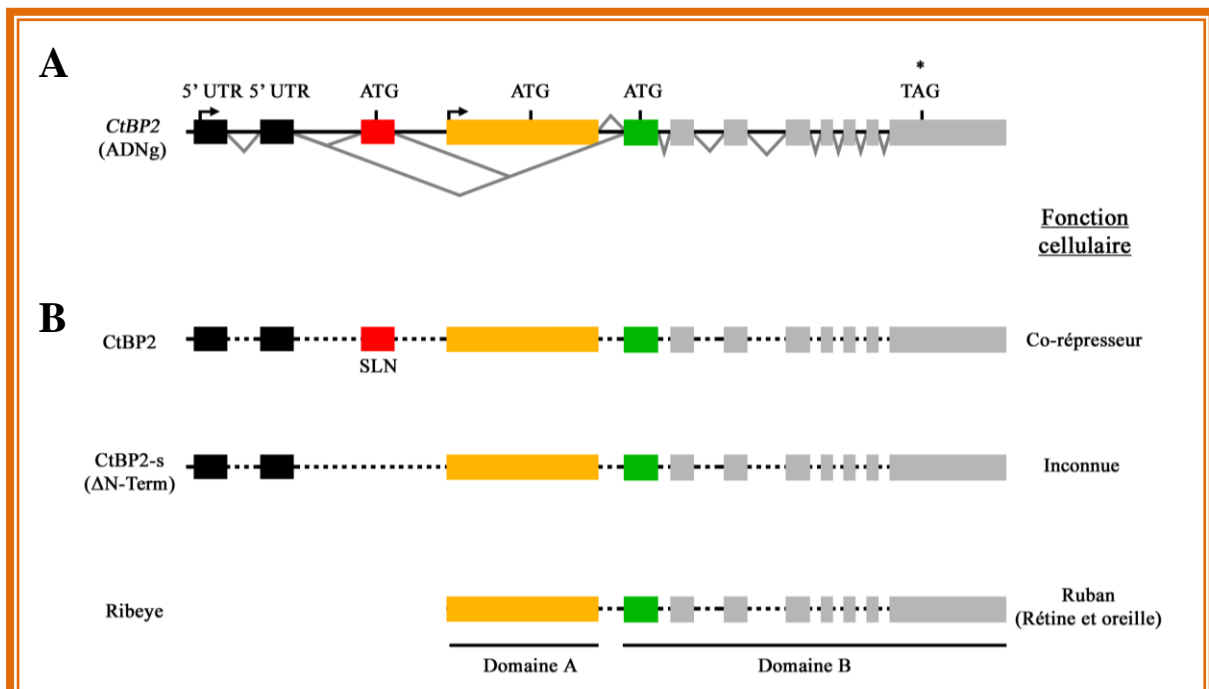
**Question 1: L'organisation spatiale des canaux calciques des zones actives des CCU-I est-elle identique à celle des CCI ?**

- Les CCEs

Contrairement aux CCI, la majorité des CCEs ne présentent que très peu de rubans à leur pôle baso-latéral (Hashimoto and Kimura, 1988 et **Fig. 7**). Une étude a démontré la présence de canaux calciques dans les CCEs matures suggérant qu'une activité d'exocytose est possible (Knirsch *et al.*, 2007). En effet, il a été démontré, grâce à la stimulation des CCEs et la mesure de l'activité électrique des fibres afférentes de type II contactant les CCEs, que celles-ci sont capables de générer des EPSCs via l'activation des récepteurs AMPA (Weisz *et al.*, 2009; Weisz *et al.*, 2012). Cependant, le rôle précis de ces fibres afférentes contactant les CCEs reste encore mal compris. Ces fibres n'informerait les centres nerveux supérieurs que lors de stimulations acoustiques de fortes intensités. Cette hypothèse est renforcée par le fait que ces fibres ne possèdent aucune activité spontanée et que seuls des bruits de très fortes

intensités peuvent déclencher des réponses sur ces fibres, reflétant leur haut seuil d'activation (Robertson, 1984; Robertson *et al.*, 1999).

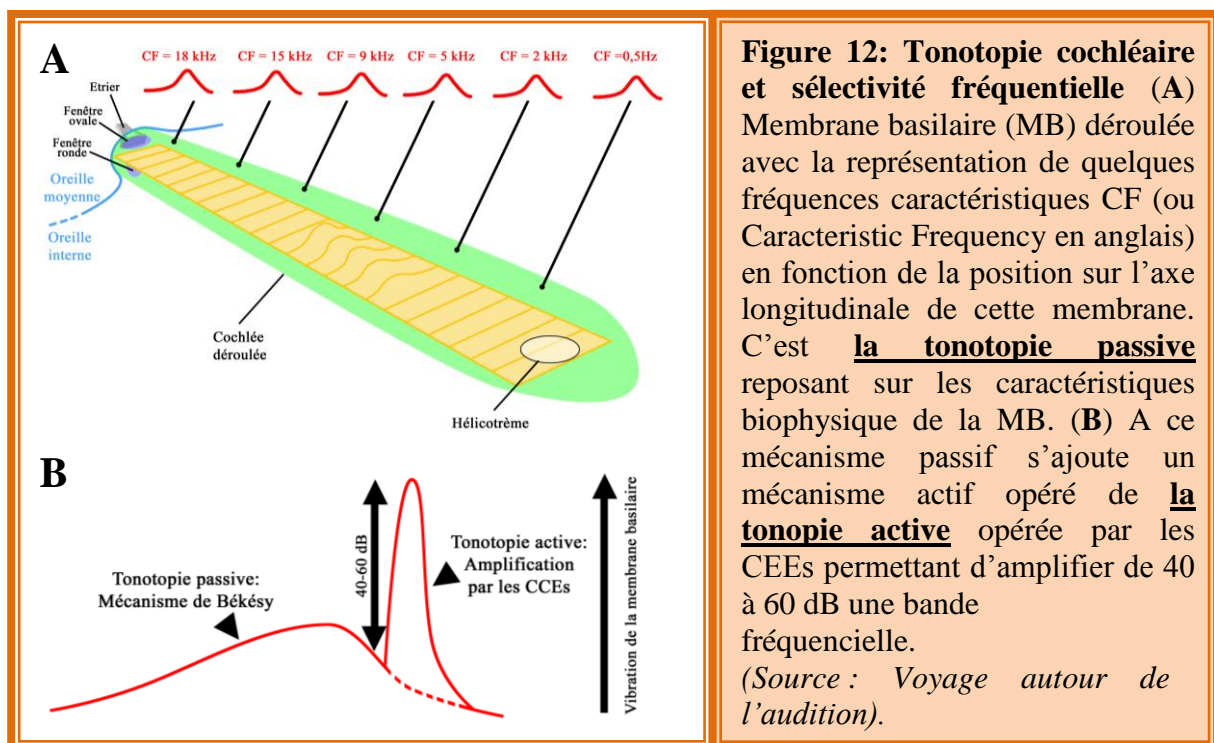
A l'inverse des CCI, où une fibre afférente contacte une seule cellule, les fibres afférentes innervant les CCEs se ramifient et contactent plus d'une dizaine de CCEs (Weisz *et al.*, 2012). Les faibles niveaux d'innervation et d'exocytose des CCEs rendent compte du rôle « mineur » de ces cellules dans l'encodage électrique du signal acoustique. En revanche, la visualisation des CCEs à la fin des années 1950 (Engstrom, 1958), par les techniques de microscopie électronique, a mis en évidence la présence de citernes intracellulaires localisées face aux fibres efférentes innervant principalement les CCEs. Ces citernes représenteraient des stocks intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  dont le rôle serait de réguler l'activité des canaux potassiques SK2 dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  (Dulon *et al.*, 1998). En effet, lorsque ce canal est muté, les réponses cholinergiques des CCEs passant par l'activation des récepteurs nicotiques  $\alpha 9/\alpha 10$  sont altérées et les fibres efférentes connectées aux CCEs dégèrent progressivement (Kong *et al.*, 2008). Le rôle des fibres efférentes serait de réguler les mouvements d'amplification des CCEs en agissant sur leur état de dépolarisation via l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers ces récepteurs cholinergiques (Dulon and Lenoir, 1996; Fuchs *et al.*, 2014; Fuchs, 2014).



**Figure 11: Représentation schématique des exons codant les protéines CtBP2, CtBP2-s et ribeye** L'ensemble de ces protéines est codé par un seul gène (A). En fonction du promoteur sélectionné (flèche), la protéine CtBP2 ou ribeye sera transcrite et traduite (B). L'isoforme courte CtBP2-s est caractérisée par l'absence de la séquence de localisation nucléaire (SLN, rouge). La protéine ribeye est composée des domaines A et B. Leur agencement en homo- ou -hétéro-dimère participe à la formation du ruban dans les cellules sensorielles auditives, vestibulaires, les photorécepteurs et les cellules bipolaires. ATG: Codon Start, TAG: codon Stop. 5'UTR: Région 5' transcrite mais non traduite (UnTranslated Region). Adapté d'après Verger *et al.*, 2006.

## 4. La membrane basilaire: un résonateur mécanique

Les travaux de von Békésy dans les années 1960 ont permis de comprendre comment la cochlée est capable de décomposer les sons complexes qu'elle perçoit en ses fréquences fondamentales, tel un prisme décomposant la lumière. C'est la membrane basilaire, sur laquelle repose l'organe de Corti, qui de part ses propriétés biophysiques, agit comme un résonateur mécanique sur laquelle se propage l'onde sonore: théorie de l'onde propagée (pour revue voir Fettiplace and Hackney, 2006). En effet, la membrane basilaire possède des propriétés d'élasticité variant le long de la cochlée. Cette élasticité spécifique la rend capable de rentrer en résonance à des fréquences sonores particulières, appelées fréquences caractéristiques (CF). C'est la tonotopie cochléaire passive. Chez l'Homme, cette membrane a une longueur d'environ 30 mm, une épaisseur de 3  $\mu\text{m}$  et sa largeur varie de la base vers l'apex de la cochlée entre 0,04 mm (à la base) à 0,36 mm (à l'apex) (**Fig. 12A**). L'étude de la distribution des fréquences caractéristiques de résonance, le long de son axe longitudinale, c'est-à-dire la meilleure fréquence à laquelle chaque partie de la membrane basilaire rentre en résonance, a permis d'établir une carte fréquentielle de la cochlée et ceci pour différentes espèces animales (Liberman, 1982; Müller et al, 2005). On s'aperçoit ainsi que la partie basale de la membrane basilaire détecte préférentiellement les sons aigus de hautes fréquences et de faibles énergies alors que la partie apicale est dévolue à l'encodage des sons graves de basses fréquences et de hautes énergies. Il est ainsi possible d'établir la gamme fréquentielle perçue par chaque espèce. Par exemple, l'Homme est capable d'analyser des sons complexes compris entre 20 Hertz (Hz) et 20 kHz. La souris entend des sons plus aigus dans une gamme de fréquence allant de 4 kHz à environ 90 kHz. Au final, seules les cellules ciliées sensorielles reposant sur la partie de la membrane basilaire rentrée en résonance avec le son incident seront stimulées. Cependant, les vibrations de la membrane basilaire ne sont pas suffisantes pour permettre de stimuler efficacement les CCIs. C'est donc l'activité mécanique des CCEs, via la prestine qui permet d'amplifier activement les vibrations de la membrane basilaire et permet d'abaisser le seuil de réponses des CCIs de 40 à 60 dB. Ce mécanisme permet d'affiner le codage du signal sonore en fréquence et de distinguer deux sons de fréquence très proche puisque cette amplification se fait sur une bande très étroite de la membrane basilaire, c'est la tonotopie active (**Fig. 12B**).



**Figure 12: Tonotopie cochléaire et sélectivité fréquentielle (A)**

Membrane basilaire (MB) déroulée avec la représentation de quelques fréquences caractéristiques CF (ou Characteristic Frequency en anglais) en fonction de la position sur l'axe longitudinale de cette membrane. C'est la tonotopie passive reposant sur les caractéristiques biophysique de la MB. (B) A ce mécanisme passif s'ajoute un mécanisme actif opéré de la tonotopie active opérée par les CCEs permettant d'amplifier de 40 à 60 dB une bande fréquentielle.

(Source : Voyage autour de l'audition).

## 5. Voies nerveuses auditives et vestibulaires

### 5.1 Fibres afférentes et efférentes de l'organe de Corti

Les neurones bipolaires du ganglion spiral font synapse d'une part avec les cellules ciliées via leurs terminaisons dendritiques (post-synapse) et de l'autre projettent leur axone pour former des terminaisons pré-synaptiques avec les neurones du noyau cochléaire au niveau du bulbe rachidien. Ces fibres afférentes du nerf auditif acheminent le signal électrique depuis l'organe de Corti où sont localisées les cellules sensorielles, jusqu'au premier relais synaptique de la voie auditive: les noyaux cochléaires. Il existe deux types de fibres nerveuses afférentes, les fibres de type I et celles de type II. Les fibres de type I sont de grosses fibres myélinisées. Chaque fibre contacte un seul ruban pré-synaptique au niveau de la CCI. Elle forme un bouton terminal post-synaptique d'un micron de diamètre environ. L'équipe de Charles Liberman (2011) a montré que la taille de ces boutons et l'épaisseur des fibres varient selon leur position sur la CCI et la taille des rubans pré-synaptiques. En effet, les fibres avec de petits boutons contactent les grands rubans sur le côté modiolar (ou neural) de la cellule, c'est-à-dire le côté de la cellule dirigé vers l'axe du ganglion spiral. Les fibres à gros boutons contactent les rubans de plus petites tailles, localisés du côté pilier ou extérieur, c'est-à-dire le côté de la cellule dirigé vers les CCEs. Les fibres afférentes à haut seuil, mais à faibles activités spontanées, sont localisées du côté modiolar et correspondraient donc aux fibres se terminant par des petits boutons alors que les fibres à bas seuil et hautes activités spontanées seraient les fibres à gros boutons (**Fig. 8**; Liberman *et al.*, 2011). Les fibres afférentes de type I constituent 95 % des neurones du ganglion spiral. Leur rôle principal est de transmettre le signal encodé par les CCIs aux noyaux cochléaires. Les fibres afférentes de types II sont de petites fibres non myélinisées faisant des synapses en passant avec une dizaine de CCEs. Le rôle de ces dernières a été assez peu étudié mais il en ressort qu'elles seraient impliquées dans la protection des cellules sensorielles puisqu'elles sont uniquement stimulées lors de signaux acoustiques de fortes intensités.

Les fibres efférentes proviennent des noyaux olivaires supérieurs latéral et médian localisés au niveau du bulbe rachidien. Le noyau olivaire médian donne naissance aux fibres efférentes contactant directement la membrane des CCIs au cours de la maturation. Ces fibres contrôlent la dépolarisation spontanée de ces cellules (*i.e.* genèse des potentiels d'action calciques) via la libération d'acétylcholine activant les récepteurs nicotiques  $\alpha 9/\alpha 10$  localisés dans la membrane des CCIs (Roux *et al.*, 2011). Il a aussi été reporté que le système efférent est important pour contrôler la mise en place et la maturation de la machinerie d'exocytose des CCIs (Johnson *et al.*, 2013). Au cours de la maturation, de nombreuses fibres disparaissent et viennent faire synapse directement avec les boutons des fibres afférentes (Bulankina and Moser, 2012). Leur rôle serait de contrôler l'excitotoxicité des fibres afférentes en limitant la dépolarisation de ces dernières. Les fibres efférentes en contact avec les CCEs ont pour origine les noyaux olivaires médians ipsi-et controlatéral. Ces fibres se terminent par un seul gros bouton synaptique (**Fig. 7**) et libèrent de l'acétylcholine permettant de réguler les mouvements mécaniques et le pouvoir d'amplification des CCEs en contrôlant leur raccourcissement et élongation, via la prestine. La mesure des activités électriques évoquées de la voie auditive (PAE : Potentiel Auditif Evoqué) ainsi que les produits de distorsion des oto-émissions acoustiques (OEAs) montrent une élévation plus prononcée des seuils auditifs avec l'âge lorsque les fibres efférentes en contact avec les CCEs et les CCIs sont coupées (Liberman *et al.*, 2014). Ces résultats confirment le rôle protecteur de ces fibres, ralentissant le vieillissement de l'organe de Corti.

## 5.2 Fibres afférentes et efférentes du vestibule

De même que pour l'organe de Corti, l'innervation du vestibule présente un système afférent et un système efférent. Les fibres afférentes sont divisées en trois catégories en fonction du type de synapse qu'elles établissent avec les cellules vestibulaires. Ainsi on distingue les fibres afférentes en bouton, similaires aux fibres afférentes de type I de l'organe de Corti et innervant principalement les cellules vestibulaires de type II. La deuxième catégorie de fibres afférentes est celles en calice en contact avec les cellules vestibulaires de type I. Pour finir, il existe des fibres afférentes di-morphiques, présentant une double terminaison, à la fois une terminaison en bouton et en calice. Ces fibres sont issues du ganglion vestibulaire (ou ganglion de Scarpa). En plus de leur forme particulière, ces fibres se distinguent par l'expression ou non de certaines protéines telles que la calrétinine mais aussi par leurs propriétés de décharge (Li *et al.*, 2008 et voir revue: Eatock and Songer, 2011). En effet, alors que les fibres afférentes en bouton ont des fréquences de décharges régulières, celles des fibres en calice sont plus irrégulières. L'épithélium vestibulaire est très peu innervé par le système efférent, celui-ci aurait un rôle dans la modulation de la fréquence des vitesses de décharges des fibres en calice via le relargage d'acétylcholine (voir revue: Eatock and Songer, 2011).

## 5.3 Les voie nerveuses centrales

### - Les noyaux cochléaires

Les premiers relais synaptiques faisant suite à celui entre les CCI et les fibres afférentes sont les noyaux cochléaires. Ils sont au nombre de trois, le noyau cochléaire ventral antérieur (NCVA), le noyau cochléaire ventral postérieur (NCVP) et le noyau cochléaire dorsal. Ces noyaux sont constitués de 7 types de neurones différents dont le rôle principal est de compléter l'encodage fréquentiel et en intensité du signal sonore. L'organisation tonopique des CCI est conservée au niveau au niveau des noyaux cochléaires permettant de conserver la composante fréquentielle du signal sonore (phase-locking).

### - Le complexe olivaire supérieur

Les fibres nerveuses du NCVA poursuivent leur chemin jusqu'au complexe olivaire supérieur composé de trois noyaux différents. Il reçoit les informations depuis les CCI via les noyaux cochléaires mais il exerce aussi un rétrocontrôle sur l'organe de Corti via les fibres efférentes qu'il projette sur les CCI et les CCEs. On distingue l'olive supérieure latérale (OSL), l'olive supérieure médiane (OSM) et le noyau médian du corps trapézoïde (NMCT). C'est au niveau de ce dernier noyau que se trouve le calice de Held, la plus grande synapse du système nerveux central. Les rôles principaux de ce complexe sont de permettre la localisation de la source sonore dans l'espace, de protéger l'oreille par son rétrocontrôle sur les CCEs et les CCI mais aussi en activant le reflexe stapédien en envoyant des projections sur le nerf facial. De plus l'ensemble de ces 3 noyaux possèdent une organisation tonotopique permettant, comme les noyaux cochléaires, de conserver la composante fréquentielle du signal sonore

### - Le noyau lemniscal latéral et le colliculus inférieur

Le noyau lemniscal est composé d'une région ventrale et d'une région dorsale dont le rôle principal est d'analyser la durée du signal sonore. Le colliculus inférieur localisé au niveau du mésencéphale, est lui aussi divisé en deux parties: une partie externe et dorsale qui seraient impliquées dans le langage et une partie centrale au niveau de laquelle on retrouve la même organisation tonotopique que celle des noyaux inférieurs.



Sa particularité est de décoder les sons de basses fréquences provenant de l'oreille ipsilatérale et les sons de hautes fréquences provenant de l'oreille contralatérale après que les fibres aient décussées au niveau du complexe olivaire. Les deux colliculi ipsi- et contralatéral échangent entre eux des informations leur permettant d'analyser le délai interaural participant à la détection de la source sonore dans l'espace.

- Le corps genouillé médian du thalamus

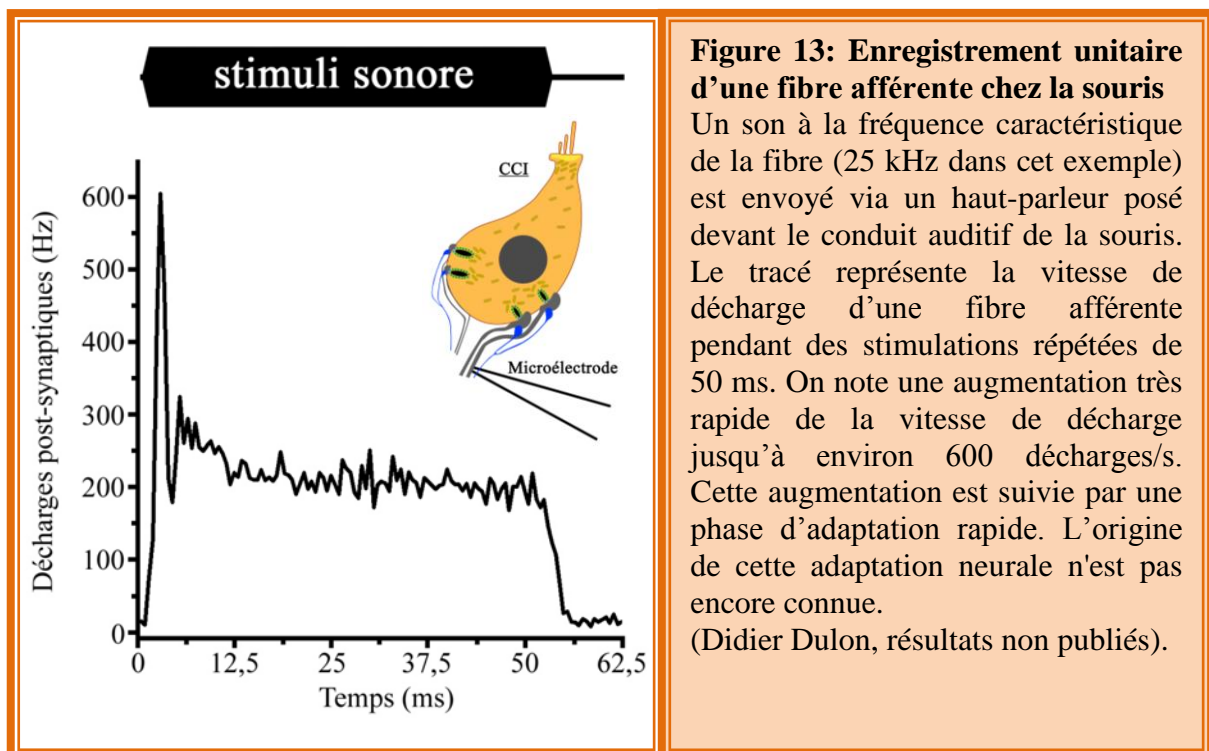
Le dernier relais intégratif de la voie nerveuse avant le cortex auditif est le corps genouillé médian recevant des projections depuis le colliculus inférieur. Il est composé d'une partie dorsale, ventrale et médiane. L'organisation tonopique y est conservée, son rôle est de continuer le traitement du signal en termes de fréquence, intensité et durée. L'ensemble des fibres du corps genouillé médian se projettent ensuite dans le cortex auditif.

#### 5.4 Techniques d'exploration fonctionnelle du système auditif

Différents tests auditifs et techniques expérimentales *in vivo* ont été mis en place pour évaluer les capacités auditives d'un sujet et pour éventuellement diagnostiquer certaines surdités.

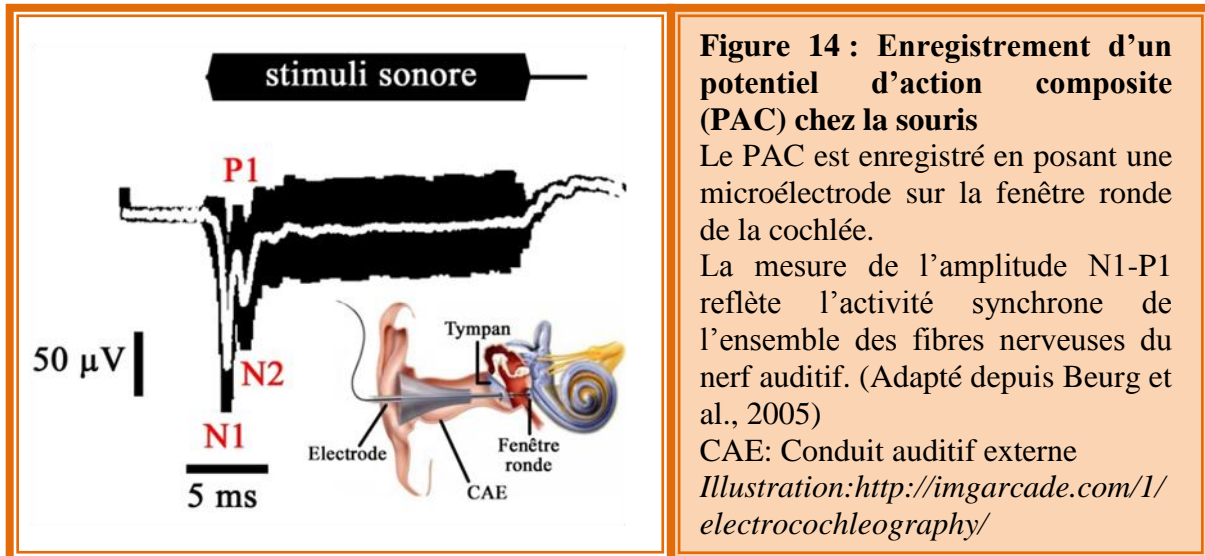
##### a. Enregistrement unitaire des fibres afférentes auditives

Cette technique expérimentale est uniquement pratiquée sur l'animal. Elle consiste à positionner et faire pénétrer une microélectrode de verre dans une fibre afférente du nerf auditif connectée aux CCI, chez l'animal vivant et anesthésié. Cette technique nous donne accès aux propriétés de décharges de chaque fibre auditive, à savoir sa fréquence caractéristique (CF), son seuil d'activation, son activité spontanée, sa vitesse de décharge maximale et sa propriété d'adaptation en fonction des différentes stimulations sonores imposées (Taberner and Liberman, 2005).



*b. Mesure des potentiels cochléaires composites*

Cette technique consiste à poser une électrode d'enregistrement sur la fenêtre ronde de la cochlée afin d'enregistrer le potentiel d'action composite (PAC) du nerf auditif. Le PAC reflète l'activité synchrone de l'ensemble des fibres nerveuses afférentes en réponse à une stimulation sonore donnée. Cette technique est aussi utilisée chez l'Homme et porte le nom d'électrocochléogramme.



**Figure 14 : Enregistrement d'un potentiel d'action composite (PAC) chez la souris**

Le PAC est enregistré en posant une microélectrode sur la fenêtre ronde de la cochlée.

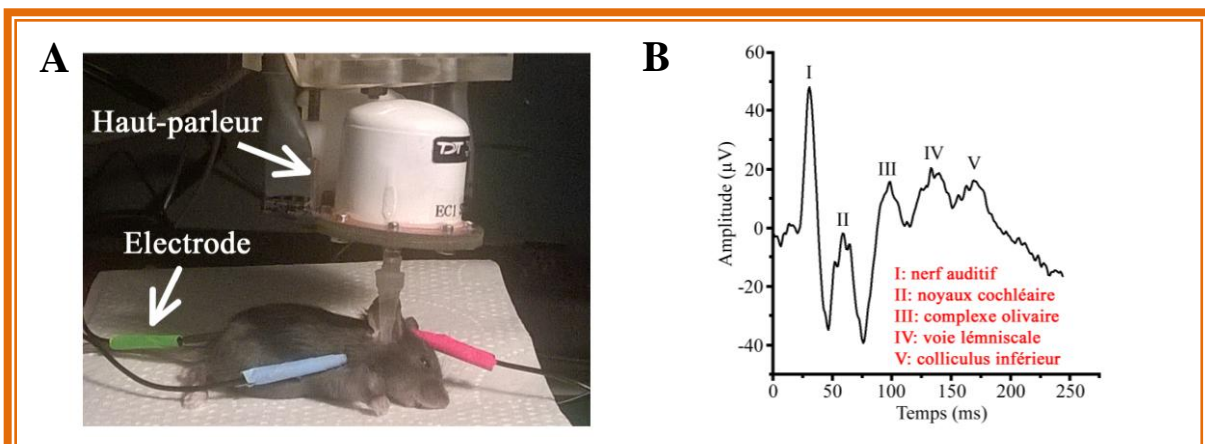
La mesure de l'amplitude N1-P1 reflète l'activité synchrone de l'ensemble des fibres nerveuses du nerf auditif. (Adapté depuis Beurg et al., 2005)

CAE: Conduit auditif externe

Illustration: <http://imgarcade.com/1/electrocochleography/>

*c. Enregistrements des PAEs*

La technique des PAEs (Potentiel Auditif Evoqué) consiste à mesurer les potentiels évoqués de chaque relais nerveux du tronc cérébral de la voie auditive par des électrodes posées sur le crâne du sujet. Cette technique permet de déterminer quels relais synaptiques sont affectés dans la surdité et si un patient est ou non un candidat potentiel pour la pose d'un implant cochléaire.



**Figure 15: Exemple d'enregistrement des PAEs chez la souris** L'animal anesthésié est placé dans un caisson anéchoïque maintenu à 37°C. Le haut-parleur est placé à l'entrée du conduit auditif externe. Trois électrodes sous-cutanées sont placées sur l'animal (A):

-2 électrodes de référence (verte et bleue)

-1 électrode pour l'enregistrement des activités évoquées (rouge) en réponse au son envoyé par le haut-parleur. Les électrodes sont reliées à un amplificateur analogue-digital et analysé avec le logiciel BioSyGRZ (Tucker Davies Technologies. (B) Exemple d'activités électriques des différents relais synaptiques de la voie auditive.



## 6. Les récepteurs post-synaptiques glutamatergiques

Lors de l'exocytose des vésicules par les zones actives des cellules sensorielles, le glutamate libéré dans la fente synaptique active les récepteurs post-synaptiques glutamatergiques (AMPARs) ancrés dans la membrane des fibres afférentes du nerf auditif (Matsubara *et al.*, 1996; Liberman *et al.*, 2011) et vestibulaire (Elezgarai *et al.*, 2003; Sadeghi *et al.*, 2014). Les AMPARs ont une perméabilité peu sélective pour les cations monovalents: le Na<sup>+</sup> et le K<sup>+</sup>. Contrairement aux récepteurs NMDA, les AMPARs ont en général une faible perméabilité pour le Ca<sup>2+</sup> (voir revue: Platt, 2007). Leur activation produit une entrée de cations dans les fibres afférentes à l'origine des EPSCs.

### 6.1 Les familles de récepteurs au glutamate

Les récepteurs glutamatergiques sont majoritairement retrouvés dans les synapses du système nerveux central où ils participent aux différents processus de mémorisation telles que la potentialisation et la dépression à long terme au sein de l'hippocampe. Il existe quatre grandes familles de récepteurs ionotropiques sensibles au glutamate classées en fonction de leurs sensibilités pharmacologiques et leur homologie de structure. On distingue les récepteurs AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid), les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate), les récepteurs KAINATE et les récepteurs Delta (voir revue: Traynelis *et al.*, 2010).

### 6.2 Structure des récepteurs glutamatergiques

Dans les quatre familles de récepteurs ionotropiques au glutamate, l'organisation moléculaire y est très proche. Ces récepteurs sont composés de quatre sous-unités identiques ou différentes d'environ 900 acides aminés. Chaque sous-unité est composée de quatre domaines distincts :

- Deux domaines extracellulaires: le domaine amino-terminal (ATD) et le domaine de fixation du ligand (Ligand Binding Domain ou LBD).
- Un domaine transmembranaire composé de trois segments transmembranaires en hélice alpha (M1, M3 et M4) et le segment M2 formé par une boucle cytosolique remontant dans la membrane plasmique.
- Un domaine c-terminal intracellulaire (CTD).

Le domaine LBD correspond au site de fixation du glutamate et de l'ensemble de ses agonistes. Le rôle du domaine ATD serait de réguler les paramètres biophysiques du pore à savoir sa probabilité d'ouverture, sa désactivation, sa désensibilisation. Néanmoins, l'absence de ce domaine n'empêche ni l'assemblage des sous-unités formant le récepteur ni son fonctionnement. Le domaine transmembranaire des quatre sous-unités forme en se rassemblant le pore du récepteur. Alors que ces trois domaines possèdent de grandes homologies de séquence entre les différentes sous-unités, le domaine intracellulaire CTD semble être plus spécifique à chaque récepteur glutamatergique et jouerait un rôle important dans la régulation de l'activité du récepteur via ses différents sites de phosphorylation et ses interactions avec certains partenaires protéiques.

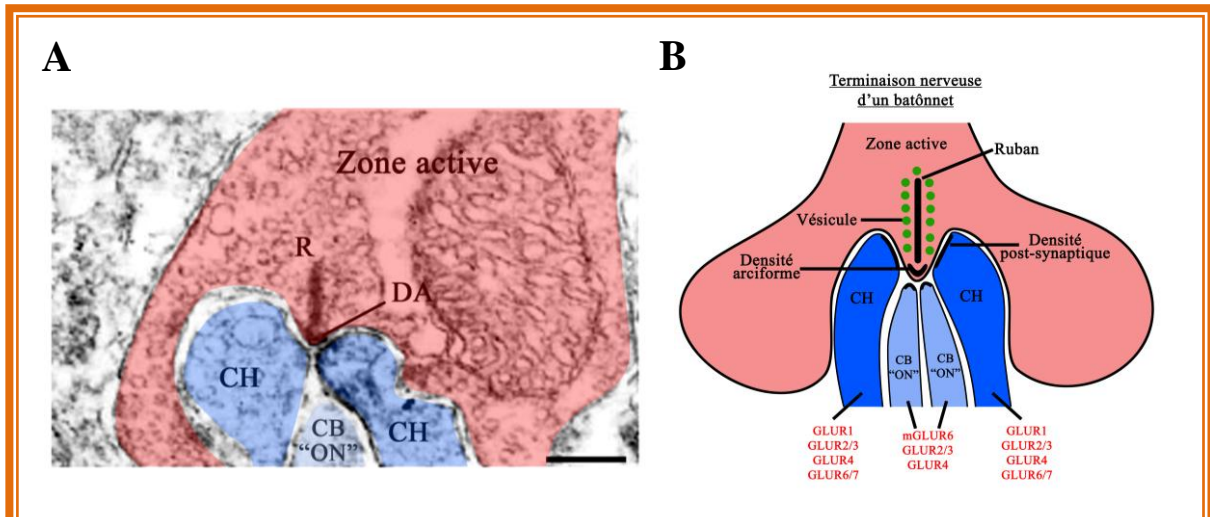
### 6.3 Les récepteurs glutamatergiques des fibres afférentes auditives et vestibulaires

Ces récepteurs ont été observés pour la première fois au sein de l'organe de Corti dans les années 1990 par la technique de microscopie électronique en utilisant des anticorps reconnaissant spécifiquement les sous-unités GLUR1 à GLUR4 des récepteurs AMPA (Matsubara *et al.*, 1996). Il a été montré que la membrane post-synaptique des fibres afférentes connectées aux CCI exprime particulièrement les sous-unités GLUR2 et GLUR3 organisées sous la forme d'un anneau en face de chaque ruban pré synaptique (Meyer *et al.*, 2009; Liberman *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2014). La sous-unité GLUR4 se distribuerait d'une manière plus diffuse en face du ruban synaptique. Ce marquage n'a cependant pas été retrouvé au niveau des fibres afférentes connectées aux CCEs. Les techniques immunohistochimiques ont permis de montrer une très bonne apposition entre les canaux calciques pré-synaptiques et les récepteurs AMPA post-synaptiques. La sous-unité  $\alpha\delta\delta 2$  jouerait un rôle important dans le maintien de cette apposition en interagissant avec la protéine PSD-95 formant la densité post-synaptique (PSD; Fell *et al.*, 2014). Il a aussi été montré récemment que la taille de l'agrégation des récepteurs AMPA était inversement corrélée à celle des rubans pré-synaptiques (Liberman *et al.*, 2011). Cette organisation participerait à distinguer les fibres afférentes les plus sensibles de celles moins sensibles. Il apparaît donc qu'à la fois les récepteurs AMPA post-synaptiques et les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  pré-synaptiques (Frank *et al.*, 2009) ont une organisation spécifique suggérant que chaque ZA peut être assimilée à une unité fonctionnelle utilisée par les CCI pour coder le signal auditif. On ne sait pas si l'agrégation plus ou moins resserrée des Cav1.3 au ruban varie avec la taille du ruban ou la taille de l'anneau post-synaptique formé par les AMPARs.

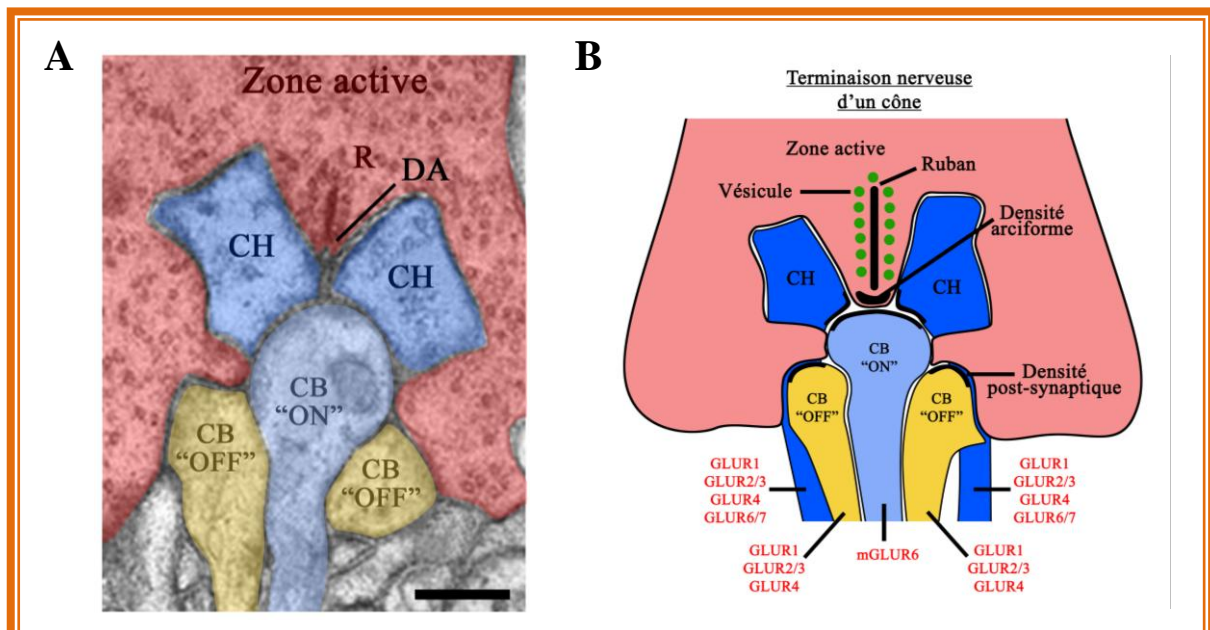
Comme les CCI, les fibres afférentes contactant les cellules ciliées vestibulaires expriment majoritairement les sous-unités GLUR2/GLUR3. Si l'on regarde leur distribution membranaire, il apparaît que ces récepteurs s'organisent non seulement en face des canaux calciques et du ruban mais aussi d'une manière très diffuse sur tout le long de la membrane post-synaptique du calice nerveux contactant la cellule de type I (Bonsacquet *et al.*, 2006; Sadeghi *et al.*, 2014). Récemment, il a été proposé que cette distribution participe à la dilution du signal pré-synaptique permettant de moduler la fréquence et la dynamique des réponses post-synaptiques (Sadeghi *et al.*, 2014).

### 6.4 Les récepteurs glutamatergiques de la rétine

Contrairement à l'organe de Corti ou au vestibule, dans lesquels la nature des récepteurs glutamatergiques apparaît très homogène (GLUR2/3 et GLUR4), la nature de ceux exprimés par les cellules sensorielles de la rétine est plus hétérogène (Hack *et al.*, 2001). En fonction du type cellulaire, différentes isoformes de récepteurs au glutamate ont été retrouvées (**Fig. 16 et Fig. 17**). Par ailleurs, il est connu que les cellules bipolaires de type « ON » faisant synapse avec les bâtonnets et les cônes sont hyperpolarisées par la fermeture d'un canal cationique dépendant du GMPc, en réponse à l'activation du récepteur métabotrope glutamatergique de type 6 (mGLUR6) couplé à la protéine G<sub>0</sub> (Nawy, 1999). Cependant, les voies métaboliques intracellulaires associées à l'activation du récepteur mGLUR6 ne sont pas encore clairement connues.



**Figure 16: Termination nerveuse d'un bâtonnet chez une souris** **A**, Zone active observée en microscopie électronique. R: Ruban, DA: Densité arciforme. Echelle: 0,2 µm (Adapté depuis Hack *et al.*, 2001). **B**, Représentation schématique de cette zone active présentant les différents isoformes de récepteurs glutamatergiques exprimés par les cellules horizontales (CH) et les cellules bipolaires (CB) « ON ».



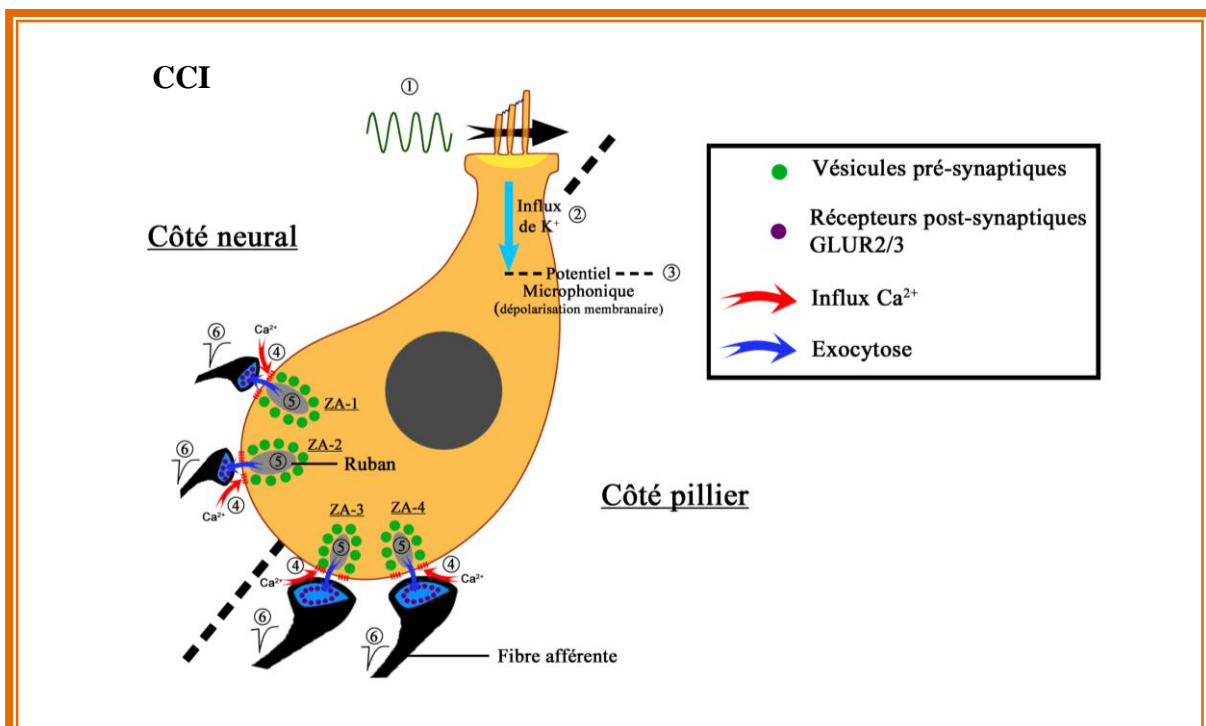
**Figure 17: Termination nerveuse d'un cône chez l'Homme** **A**, Zone active observée en microscopie électronique. R: Ruban. Echelle: 0,25 µm. **B**, Représentation schématique de cette zone active montrant les différents isoformes de récepteurs glutamatergiques exprimés par les cellules horizontales (CH) et les cellules bipolaires (CB) « ON » et « OFF ». A noter qu'il s'agit d'une représentation simplifiée.

Source: <http://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/Photoreceptors>.

## 7. Transmission synaptique: transduction du potentiel microphonique en impulsions nerveuses

### 7.1 Mécanisme général

La déflexion des stéréocils génèrent une dépolarisation graduelle des cellules ciliées. La nature cyclique de l'onde acoustique génère ce que l'on appelle un potentiel microphonique, potentiel en phase avec la stimulation sonore jusqu'à 1-2 kHz. Cette dépolarisation est à l'origine de l'activation des canaux calciques Cav1.3 (Platzer *et al.*, 2000, Dou *et al.*, 2004). Ces canaux calciques sont situés au niveau des ZAs et permettent une augmentation focalisée et graduelle du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Frank *et al.*, 2009; Rutherford, 2015). Le senseur calcique présumé des cellules ciliées, l'otoferline (Roux *et al.*, 2006; Dulon *et al.*, 2009; Beurg *et al.*, 2010; Pangrisc *et al.*, 2010), en détectant l'influx calcique déclenche la fusion vésiculaire et l'extrusion du glutamate dans la fente synaptique. Le glutamate, en se fixant sur les récepteurs AMPA post-synaptiques (GLUR2-GLUR3; Matsubara *et al.*, 1996) engendre la genèse de courants post-synaptiques excitateurs (EPSCs, Glowatzki and Fuchs, 2002; Grant *et al.*, 2010), Ces derniers peuvent ou non permettre la formation de potentiels d'actions capables d'être interprétés par les relais synaptiques supérieurs de la voie auditive jusqu'au cortex temporal. (Fig. 15). Notre laboratoire a aussi démontré que les CCEs présentent transitoirement au cours du développement une exocytose dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  et de l'otoferline (Beurg *et al.*, 2008).



**Figure 18: Transmission synaptique au niveau des synapses à ruban des CCI**

La déflexion des stéréocils (1) génère un influx de potassium entrant (2) à travers les canaux de mécano-transduction (non représentés) à l'origine de la dépolarisation cellulaire (3). Cette dépolarisation déclenche l'activation des canaux calciques Cav1.3 au niveau des différentes ZAs, ici seules quatre ZAs sont représentées (4). Le  $\text{Ca}^{2+}$  déclenche l'exocytose du glutamate dans les fentes synaptiques (5) qui à l'origine des EPSCs via l'activation des récepteurs AMPA (GLUR2/3) (6).

## 7.2 Les étapes de l'exocytose synaptique

Le cycle vésiculaire des synapses centrales et périphériques doit être finement régulé afin de permettre aux cellules d'assurer une exocytose en réponse à chaque potentiel d'action (synapse conventionnelle) ou à chaque potentiel récepteur comme par exemple dans les cellules ciliées. L'importance de cette régulation est d'autant plus grande pour les CCI car elles doivent pouvoir générer des vitesses de décharges extrêmement élevées au niveau des fibres nerveuses afférentes et ceci en phase avec le signal acoustique (« phase-locking » jusqu'à 1-2 kHz), tout en étant capable de soutenir une exocytose sans fatigue pendant toute la durée de la stimulation (Kiang, 1965).

Le cycle vésiculaire est classiquement divisé en sept étapes (Südhof, 1995; Südhof, 2004) :

- Acheminement ou ravitaillement des vésicules aux sites de fusion (*i.e.* ZAs).
- Regroupement des vésicules (ancrage) proche des sites de fusion. Ce rôle est supposé être supporté par les rubans dans les cellules ciliées.
- L'arrimage ou « docking » des vésicules à la membrane.
- L'amorçage ou « priming » permettant de rendre les vésicules compétentes pour la fusion dépendante du  $Ca^{2+}$ .
- La fusion vésiculaire.
- L'endocytose, un processus indispensable pour éviter le gonflement et la mort cellulaire. Il permet aussi à la cellule de reformer ses stocks de vésicules et de « nettoyer » les sites de fusion encombrés par l'ensemble des protéines insérées dans la membrane vésiculaire évitant un ralentissement de l'exocytose.
- Ré-acidification des vésicules et chargement de celles-ci par les neurotransmetteurs.

## 7.3 Les acteurs moléculaires de l'exocytose

Afin de contrôler le trafic vésiculaire et donc l'exocytose, les cellules ont mis en place des acteurs protéiques agissant aux différentes étapes du cycle vésiculaire assurant à la fois le renouvellement des protéines à la membrane plasmique, le recyclage de ces mêmes protéines vers les endosomes et un apport continu de vésicules aux sites de fusion.

### a. Le système nerveux central

- Les protéines SNAREs

Les cellules de manière générale, transportent de nombreuses protéines « cargos » jusqu'à leur membrane plasmique. Il s'agit en général de canaux ioniques, de transporteurs et de récepteurs. L'acheminement de ces cargos commence par leur transfert, via des vésicules de transport, de compartiments en compartiments intracellulaires, depuis le réticulum endoplasmique (site de synthèses protéiques) en passant par l'appareil de Golgi (site de glycosylation) jusqu'à la membrane plasmique. Durant ces différentes étapes, la membrane des vésicules de transport fusionne avec ces différents compartiments cellulaires afin de transférer ces protéines. C'est en analysant la composition protéique de la membrane de ces vésicules ainsi que celle de la membrane plasmique, via des techniques de purification membranaire, que les protéines SNAREs (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor) ont été mises en évidence. Trois protéines appartenant à la famille des SNAREs ont été identifiées. La première ayant été identifiée dans le cerveau est la synaptobrevine 1 (VAMP-1 ou vesicle-associated membrane protein-1). Cette protéine est localisée dans la membrane des vésicules de transport et des vésicules sécrétrices, celle-ci constitue la v-SNARE (Trimble *et al.*, 1988). Deux autres protéines ont été identifiées dans la membrane plasmique des neurones, la protéine SNAP-25 (synaptosome-associated protein of

25 kDa; Oyler *et al.*, 1989) et la syntaxine (Inoue *et al.*, 1992). Cette dernière et plus particulièrement l'isoforme 1A, est impliquée dans l'étape d'arrimage ou « docking » des vésicules sécrétrices à la membrane (Bennett *et al.*, 1992). La SNAP-25 et la syntaxine sont localisées dans la membrane plasmique et constituent les t-SNAREs (target; Ungar and Hughson, 2003). Le rôle des protéines v- et t-SNARE dans le trafic et la fusion vésiculaire a été démontré par l'utilisation de toxines ciblant spécifiquement ces protéines. Deux toxines ont été utilisées, la toxine botulique et la toxine tétanique (Blasi *et al.*, 1993; Blasi *et al.*, 1993). L'utilisation de ces toxines fixant et clivant les protéines SNAREs entraînent l'abolition de la transmission synaptique (Link *et al.*, 1992; Schiavo *et al.*, 1992). Quelques années après, il a été montré que les protéines v- et t-SNARE sont capables de former un complexe protéique très stable (Sutton *et al.*, 1998) maintenant les vésicules très proches de la membrane. Ce complexe protéique, constitué de quatre hélices alpha (2 hélices SNAP-25, 1 hélice VAMP-1 et une hélice syntaxine 1A) permet d'amorcer les vésicules et les maintenir prêtes à fusionner dès que le  $Ca^{2+}$  entre dans la cellule, formant ce que l'on appelle communément le RRP (Readily Releasable Pool). Ces protéines sont très conservées à travers les espèces et sont exprimées de manière ubiquitaire dans l'ensemble des cellules. La complexine (Cplx), une protéine présente sous 4 différentes isoformes (Cpx1-4) a été identifiée comme essentielle dans la régulation de la fusion, à la fois en catalysant la formation du complexe SNARE mais aussi en le bloquant jusqu'à l'arrivée du signal calcique inhibant fortement la fusion spontanée dans le système nerveux central (SNC; McMahon *et al.*, 1995; Kummel *et al.*, 2011). Les isoformes Cpx1 et Cpx2 sont majoritairement exprimées dans le SNC, où elles permettraient de synchroniser et d'augmenter la cinétique d'exocytose en réponse à l'influx calcique (Dhara *et al.*, 2014).

- Les protéines Rab, RIM et RBPs

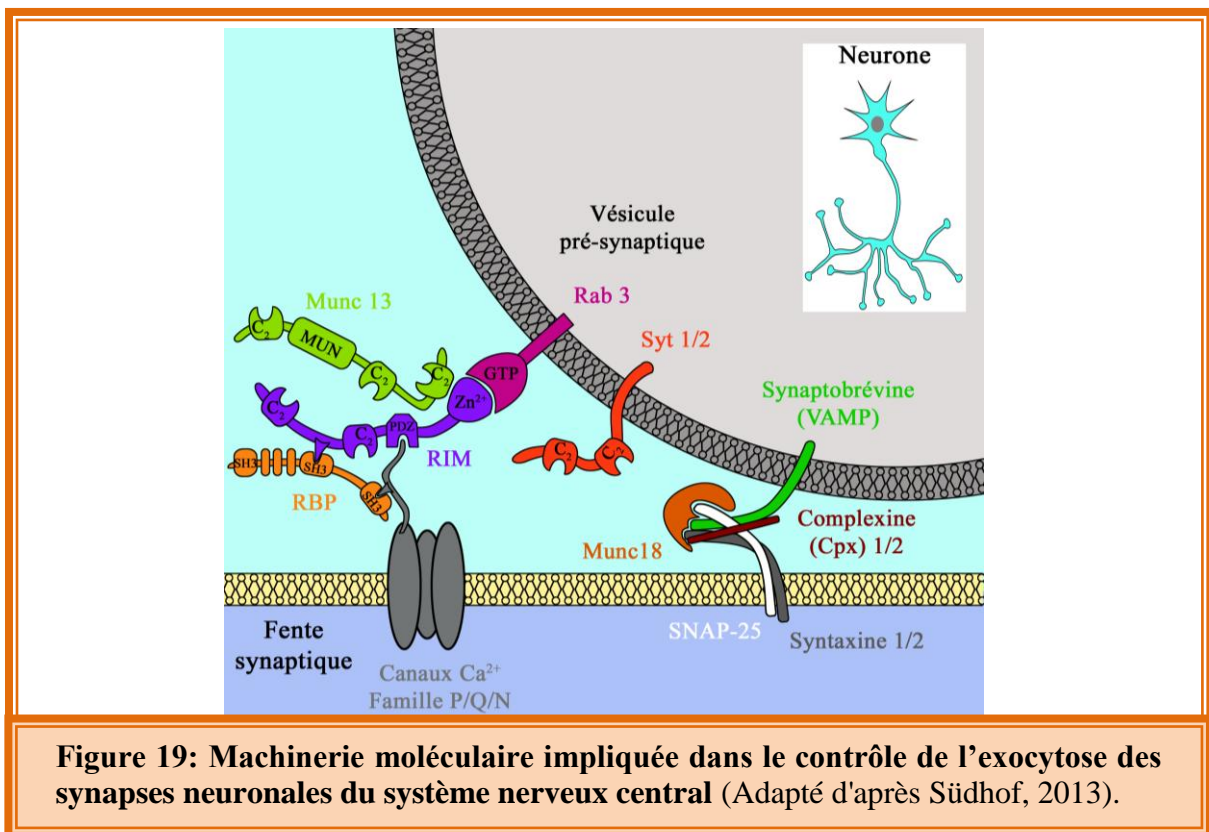
Bien que les protéines SNAREs soient capables à elles seules de déclencher la fusion entre deux membranes, dans le cadre d'études *in vitro*, de nombreuses études ont montré l'importance des protéines Rab à la fois dans le contrôle du trafic vésiculaire mais aussi dans les étapes finales de fusion membranaire. Cette famille a la particularité de fixer directement ou indirectement les protéines SNAREs. Ce sont de petites GTPase qui ont la capacité de se lier à un ensemble de protéines impliquées dans le trafic vésiculaires et les v et/ou t-SNARE, permettant de réguler l'association du complexe SNARE (Martinez and Goud, 1997). La famille des protéines Rab comporte de nombreuses isoformes, chacune de ces isoformes ayant un rôle particulier dans le contrôle du trafic vésiculaire entre les différents compartiments intracellulaires. Les protéines Rab sont des protéines ubiquitaires, mais certaines isoformes sont exprimées seulement par quelques types cellulaires. Ainsi, les protéines Rab 3A et C sont exprimées uniquement dans la membrane des vésicules des neurones et des cellules neuro-endocrines (Rothman, 1994; Holtz *et al.*, 1994; Johannes *et al.*, 1994) régulant la fusion vésiculaire (Südhof, 1995). La protéine Rab 3 agit aussi par le biais de différents effecteurs qu'elle a la particularité de fixer. Il s'agit des protéines RIM (ou Rab3 Interacting Molecules). Il existe 6 principales isoformes codées par quatre gènes différents (Wang and Südhof, 2003). Elles sont composées de domaines PDZ et de un ou deux domaines C2 suggérant que ces protéines sont capables de fixer le  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Ces protéines ont pour rôle de réguler la transmission synaptique en agissant sur les étapes finales de la fusion vésiculaire, l'arrimage et l'amorçage par son interaction avec la protéine Munc13 (**Fig. 19**; Wang *et al.*, 1997; Südhof, 2013). Elles ont aussi pour rôle de concentrer l'influx calcique en organisant les canaux calciques au niveau des sites de fusion, soit par leur interaction directe avec la sous-unité  $\alpha 1$  du canal calcique via leur domaine PDZ (Kaeser *et al.*, 2010) soit par l'intermédiaire d'une autre classe de protéine, les protéines de liaison aux RIM (RBPs ou RIM Binding Proteins). Ces protéines serviraient de lien entre les protéines RIM et la sous-unité  $\alpha 1$  du canal calcique (Hibino *et al.*, 2002).



Ainsi, les protéines Rab 3, RIM et RBPs formeraient un réseau protéique complexe permettant de réguler l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  par l'organisation des canaux calciques aux sites de fusion (Südhof, 2013).

- Les protéines Munc 13 et Munc 18

A la fin des années 1990, une nouvelle famille de protéine à domaine C2, les protéines Munc 13 ou « mammalian uncoordinated 13 » (Ashery *et al.*, 2000; Rosenmund *et al.*, 2002) et Munc 18 (Voets *et al.*, 2001; Zilly *et al.*, 2006) a été décrite comme essentielle dans le contrôle des étapes finales de l'exocytose. L'utilisation de la technique du patch clamp, sur des modèles animaux mutés pour ces protéines, a permis de montrer que les protéines Munc 13-1 et Munc 13-2 sont impliquées dans l'étape d'amorçage des vésicules à la membrane. La protéine Munc 18 serait plus impliquée dans l'étape d'arrimage. De plus, il apparaît que la protéine Munc 18 serait essentielle à l'assemblage entre la syntaxine 1 et la protéine SNAP-25 en permettant par la suite la formation du complexe SNARE avec la synaptobrevine (Fig. 19; Zilly *et al.*, 2006).



b. Les photorécepteurs et les cellules bipolaires de la rétine

Dans les cellules bipolaires et les photorécepteurs, l'identification et l'étude du rôle des protéines impliquées dans le contrôle de l'exocytose a fait l'objet de nombreuses investigations. Comme les synapses centrales, les cellules de la rétine expriment les protéines SNAREs (Ullrich and Südhof, 1994; Morgans *et al.*, 1996; Reim *et al.*, 2009). Ces études montrent la présence de la SNAP-25, des syntaxines 1 à 3 et des synaptobrevines 1 et 2.

Néanmoins, parmi les trois isoformes de la syntaxine, seule la syntaxine 3 a été retrouvée au niveau des synapses à ruban des cellules bipolaires et des photorécepteurs.

De plus, l'étude d'Ullrich et Südhof (1994) a aussi démontré que les synapses à ruban de la rétine expriment de nombreuses protéines aussi présentes dans les synapses centrales. Il s'agit en particulier de Munc 18 et Rab 3. La présence de Munc18 suggère que l'arrimage des vésicules pré-synaptiques repose sur des mécanismes moléculaires identiques à ceux des synapses centrales. Très récemment, une équipe a démontré le rôle important des protéines RIM 1 et RIM 2 dans le contrôle de flux intracellulaire calcique par leur capacité à réguler l'ouverture des canaux Cav1.4 (Grabner *et al.*, 2015). Contrairement aux synapses centrales, l'expression des protéines RIM n'est pas indispensable pour l'organisation et le maintien de ces canaux calciques au niveau des ZAs.

Des expériences de co-immunoprécipitation, de recouvrement de fonctions ainsi que des mesures des variations de la capacité membranaire (reflétant l'exocytose), montrent que les Cpx3 et Cpx4 sont capables de fixer les protéines SNAREs. Elles auraient le même rôle que les Cpx1 et Cpx2, à savoir la stabilisation du complexe SNARE prévenant la fusion spontanée, dans le but de maintenir les vésicules du RRP (Reim *et al.*, 2005; Reim *et al.* 2009; Vaithianathan *et al.*, 2013). Ce rôle est particulièrement important dans ce type de synapses car elles doivent déclencher une exocytose très rapide et à de grandes fréquences nécessitant le maintien du RRP au niveau des rubans (**Fig. 20A**).

### *c. Les cellules ciliées sensorielles: des synapses non-conventionnelles*

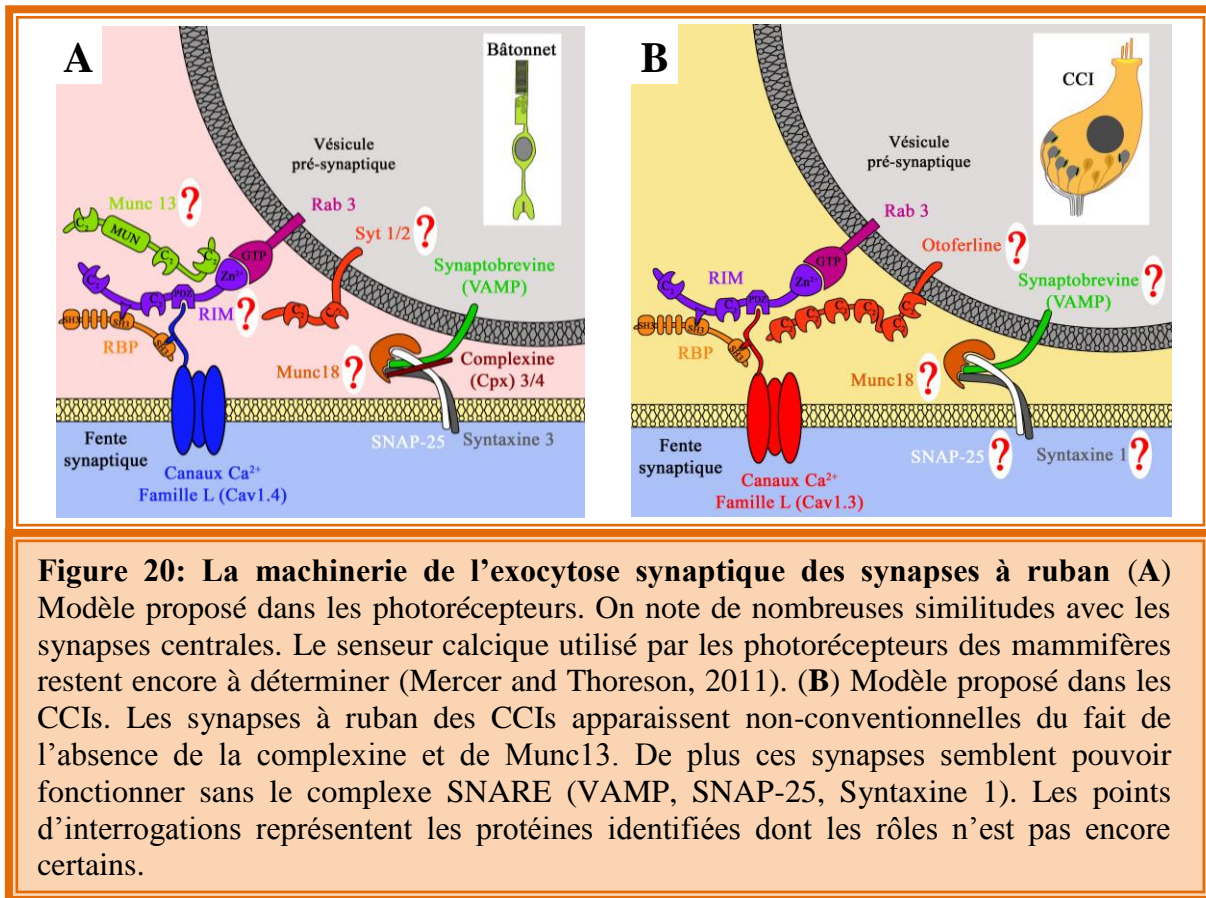
A la fin des années 1990, une étude a montré que les cellules ciliées auditives, aussi bien les CCI que les CCEs, expriment les protéines SNAREs à savoir la syntaxine 1A, la synaptobrevine 1 et la protéine SNAP-25 (Safieddine and Wenthold, 1999). Ces résultats suggèrent que les synapses à ruban des cellules ciliées utilisent les mêmes mécanismes moléculaires que ceux du système nerveux central ou des cellules de la rétine pour contrôler la fusion vésiculaire. Cependant, il a montré que l'exocytose des CCI était insensible à l'ensemble des sérotypes de la toxine botulique (Nouvian *et al.*, 2011). Ce résultat suggère que les synapses des cellules ciliées fonctionnent de manière non-conventionnelle. De même, cette étude n'a pu détecter l'expression des protéines SNAREs qu'au niveau des fibres afférentes du nerf auditif mais pas dans les CCI. De manière très surprenante, aucune isoforme de la complexine n'a été retrouvée dans les CCI. Cependant, la Cpx1 jouerait un rôle dans la transmission synaptique entre les neurones du ganglion spiral et les neurones des noyaux cochléaires (Strenzke *et al.*, 2009).

Les protéines Rab 3 et Rab 8 ont aussi été retrouvées à la fois dans la cochlée et la rétine (Uthaiyah and Hudspeth, 2010). Bien que leur rôle reste encore à déterminer dans ces cellules, on peut facilement imaginer qu'elles interviennent dans la régulation du trafic vésiculaire des cellules sensorielles et dans la mise en place des canaux calciques Cav1.3. En effet, il a été montré que les protéines RIM sont importantes pour le contrôle de l'exocytose des CCI (Jung *et al.*, 2015). Cette étude confirme le rôle des protéines RIM (RIM2 $\alpha$  et RIM2 $\beta$ ) dans le maintien de l'organisation resserrée des canaux Cav1.3 sous le ruban. Comme pour les synapses centrales, le rôle des RIM passerait par les RBPs retrouvées au niveau des rubans des CCI (Hibino *et al.*, 2002).

Le rôle des protéines Munc 13 a aussi été étudié dans les cellules ciliées. Chez les souris mutées pour les différentes isoformes de Munc 13, l'exocytose des CCI n'est pas altérée (Vogl *et al.*, 2013). Ce résultat est en accord avec l'étude d'Uthaiyah et Hudspeth (2010) n'ayant pas trouvé d'expression de cette protéine dans la cochlée. Ceci suggère que les CCI utilisent un autre mécanisme pour amorcer les vésicules à la membrane renforçant l'idée que les synapses des cellules ciliées sont non-conventionnelles.



Les techniques de Western-blot ont révélé que la protéine Munc 18 est exprimée dans la cochlée sans savoir précisément quelles cellules expriment cette protéine (Uthaiyah and Hudspeth, 2010). Encore aujourd'hui, le rôle de Munc 18 dans la régulation de l'exocytose des CCI n'a pas encore été étudié (**Fig. 20B**).

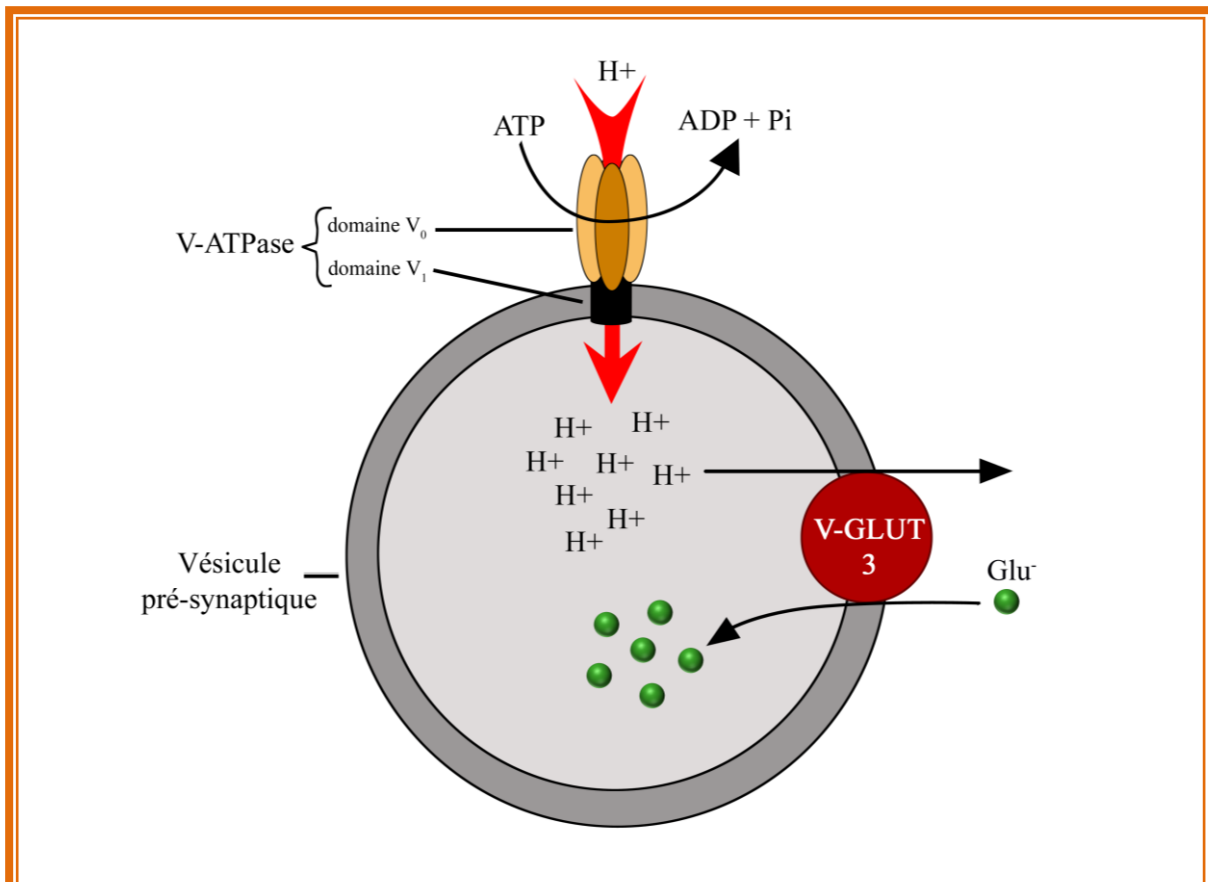


#### 7.4 Les vésicules à glutamate

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur majoritairement utilisé par le système nerveux central. Il est aussi libéré par les cellules bipolaires et les photorécepteurs de la rétine, et dans le cadre de ma thèse, par les cellules sensorielles auditives et vestibulaires. Afin que les cellules puissent excréter le glutamate par l'exocytose vésiculaire, celui-ci doit être chargé dans les vésicules pré-synaptiques avant leur acheminement vers les sites de fusion. Ces vésicules seront ainsi compétentes et pourront déclencher la genèse d'EPSCs sur les fibres afférentes suite à leur fusion avec la membrane plasmique. Le chargement des vésicules en glutamate est un processus utilisant deux familles de protéines, les transporteurs vésiculaires de glutamate (V-GLUT) et la pompe à proton vésiculaire dépendante de l'ATP (V-ATPase).

##### a. Mécanisme de chargement vésiculaire en glutamate

Le mécanisme de chargement des neurotransmetteurs peut-être généralisé à l'ensemble des synapses chimiques, c'est-à-dire les synapses à acétylcholine, à GABA/Glycine, à monoamines et à glutamate (Chaudhry *et al.*, 2008). Deux partenaires protéiques, la protéine V-GLUT et la protéine V-ATPase exprimés dans la membrane des vésicules, (**Fig. 21**) travaillent en synergie pour transporter activement le glutamate dans les vésicules sécrétrices.



**Figure 21: Mécanisme de chargement des vésicules pré-synaptiques en glutamate**

L'hydrolyse de l'ATP par le domaine V<sub>0</sub> de la pompe V-ATPase permet d'apporter l'énergie nécessaire à l'entrée des protons (H<sup>+</sup>) à travers le pore, formé par le domaine V<sub>1</sub>. Le gradient de H<sup>+</sup> ainsi généré entre le milieu intracellulaire et intra-vésiculaire est utilisé par le transporteur V-GLUT-3 (cellules ciliées) pour charger le glutamate dans les vésicules pré-synaptiques. Il est à noter qu'il s'agit d'une représentation simplifiée de la protéine V-ATPase. (Adaptée depuis Beyenbach and Wicczorek, 2006).

*b. La pompe à proton vésiculaire: V-ATPase*

Il s'agit d'une grosse protéine membranaire dont le poids moléculaire varie entre 500 et 1000 kDa. Sa structure moléculaire est relativement proche de celle de l'ATP synthase, exprimée dans la membrane des mitochondries. Elle est composée de quatorze protéines agencées en deux grands domaines : 1) le domaine V<sub>0</sub> transmembranaire formant un pore dans la membrane vésiculaire et 2) le domaine cytoplasmique V<sub>1</sub>, dont le rôle est d'hydrolyser l'ATP permettant ainsi le transport actif des protons dans les vésicules depuis le milieu intracellulaire (voir revue: Beyenbach and Wicczorek, 2006). L'entrée des protons dans les vésicules par la V-ATPase fournit l'énergie nécessaire au transport du glutamate via les transporteurs spécifiques glutamatergiques.

### c. Les transporteurs vésiculaires glutamatergiques: V-GLUT

Ce sont des protéines d'environ 60 kDa insérées dans la membrane des vésicules pré-synaptiques des synapses utilisant le glutamate comme neurotransmetteur. Leur activité est étroitement associée à celle de la V-ATPase.

Cette protéine présente 3 isoformes: V-GLUT1; V-GLUT2 et V-GLUT3 (Takamori, 2000 et voir revue: Takamori, 2006). Les isoformes 1 et 2 sont majoritairement exprimées dans le cerveau alors que l'isoforme 3 présente une distribution plus ubiquitaire (Fremeau *et al.*, 2002). Cette dernière est l'isoforme exprimée par les CCI (Seal *et al.*, 2009; Akil *et al.*, 2012), les cellules sensorielles vestibulaires (Obholzer *et al.*, 2008) et les cellules amacrines de la rétine (Johnson *et al.*, 2004). Les synapses des photorécepteurs et des cellules bipolaires expriment majoritairement V-GLUT1. Néanmoins, l'étude des caractéristiques biologiques de ces trois isoformes n'a pas montré de différence majeure, soulevant la question suivante: Quels sont les avantages procurés à la cellule lorsqu'elle utilise l'une ou l'autre des isoformes V-GLUT ?

## 7.5 Le signal calcique et sa modulation

L'exocytose, dans la majorité des cellules sécrétrices, est déclenchée par une entrée de  $Ca^{2+}$  via les canaux calciques localisés dans la membrane plasmique (**voir chapitre 11: les canaux calciques**). Suite à l'influx calcique, des protéines appelées senseurs calciques (**voir chapitre 10: Les senseurs calciques : la « gâchette » de l'exocytose**), permettent de contrôler et de déclencher la fusion vésiculaire.

Grâce à des modèles mathématiques, il a été montré que la concentration en  $Ca^{2+}$  intracellulaire diminue exponentiellement depuis la bouche du canal, jusqu'à plusieurs centaines de nanomètres, loin dans le cytoplasme (Naraghi and Neher, 1997). Il apparaît que cette décroissance est modulée par différentes familles de protéines capables de fixer le  $Ca^{2+}$ .

Pour que l'exocytose soit la plus efficace possible, c'est-à-dire déclenchée par le minimum de  $Ca^{2+}$  intracellulaire, le signal calcique doit être focalisé au niveau des sites de fusion. Dans les cellules sensorielles, la focalisation de signal calcique est en grande partie sous la dépendance du ruban, jouant le rôle de barrière de diffusion (Graydon *et al.*, 2011). En plus des réserves calciques intracellulaires (réticulum endoplasmique, mitochondrie) et des protéines membranaires impliquées dans le recyclage du  $Ca^{2+}$  intracellulaire (pompe PMCA, SERCA et échangeur Na/Ca), il existe certaines protéines appelées tampons calciques, chélatant très rapidement le  $Ca^{2+}$  afin de restreindre l'augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire au niveau des ZAs. Ces protéines ont aussi pour rôle de maintenir un niveau faible de  $Ca^{2+}$  intracellulaire pour empêcher le déclenchement de processus apoptotiques.

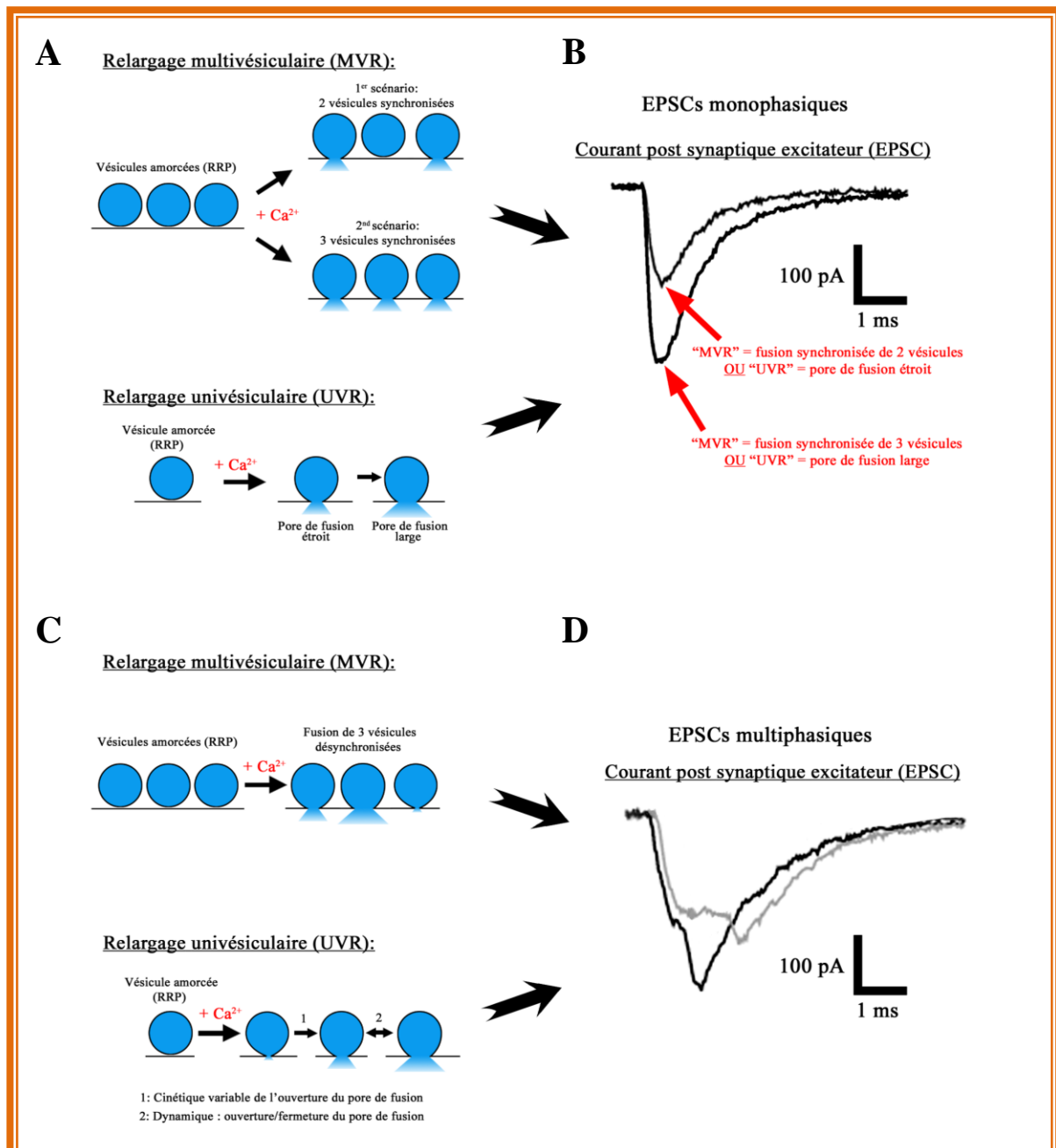
En plus de la calmoduline, trois principaux tampons calciques endogènes modulent la transmission synaptique au niveau des neurones du système nerveux central (voir revue: Schwaller *et al.*, 2002; Rusakov, 2002), de la rétine (Mercer and Thoreson, 2011) et des cellules ciliées sensorielles (Hackney *et al.*, 2006; Pangrisc *et al.*, 2015). Il s'agit de la calrétinine, la calbindine et la parvalbumine. Ce sont des protéines possédant des domaines EF capables de fixer le  $Ca^{2+}$ . Dernièrement, l'équipe de Tobias Moser a généré un modèle murin n'exprimant plus ces trois protéines («  $Ca^{2+}$  binding proteins »; Pangrisc *et al.*, 2015). Ces souris ne sont pas sourdes et présentent une exocytose augmentée en réponse à de longues stimulations. Ce résultat renforce le rôle important des «  $Ca^{2+}$  binding proteins » pour restreindre l'influx calcique au niveau des sites de fusion et limiter l'exocytose extra-synaptique.

## 8. Fusion multi-vésiculaire ou fusion uni-vésiculaire ?

Le nombre de vésicules formant le RRP (Readily Releasable Pool) a été estimé entre 30 et 50 vésicules par ZA dans les CCI (Johnson *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2008). Des valeurs similaires ont aussi été retrouvées chez la tortue (Schnee *et al.*, 2005), chez les amphibiens (Patel *et al.*, 2012) et chez le poulet (Eiden *et al.*, 2004). La question qui se pose est de savoir si l'activation des canaux calciques en phase avec le potentiel microphonique, déclenche à chaque cycle, la fusion d'une seule vésicule (= fusion uni-vésiculaire ou UVR) ou la fusion simultanée de plusieurs vésicules (= fusion multi-vésiculaire ou MVR). Le mode MVR est généralement utilisé par de nombreuses ZAs du système nerveux central, tels que les régions corticales et subcorticales, l'hippocampe (Watanabe *et al.*, 2013; voir leur Fig. 4A) et le cervelet (voir revue: Rudolph *et al.*, 2015). L'avantage du MVR est qu'il permet d'assurer que, chaque potentiel d'action pré-synaptique, déclenche la fusion d'au moins une vésicule, permettant ainsi une transmission synaptique efficace. Des arguments en faveur d'un tel mécanisme dans les synapses à ruban des cellules ciliées auditives ont été apportés par l'analyse des EPSCs sur les fibres afférentes du nerfs auditifs (Glowatzki and Fuchs, 2002; Goutman and Glowatzki, 2007; Grant *et al.*, 2010; Goutman, 2012). L'étude de leurs amplitudes et de leurs décours temporels ont permis de caractériser le degré de synchronisation du MVR. On distingue ainsi les EPSCs monophasiques de grandes amplitudes, reflétant la fusion coordonnée d'un ensemble de vésicules (**Fig. 22A**, partie haute et **Fig. 22B**). Les EPSCs multiphasiques, dont l'amplitude est légèrement réduite, reflètent un certain degré de désynchronisation du MVR (**Fig. 22C**, partie haute et **Fig. 22D**). Le mode MVR apparaît comme le mécanisme de fusion le plus adapté aux cellules ciliées. Ces cellules sensorielles doivent en effet pouvoir assurer une fusion vésiculaire efficace à chaque cycle pour permettre un « phase-locking » des réponses neurales post-synaptiques jusqu'à 1 à 2 kHz.

Néanmoins, une étude récente propose un nouveau mécanisme de fusion impliquant le mode UVR pour expliquer les EPSCs enregistrés sur les boutons post-synaptiques des CCI. Ce mécanisme UVR passerait par une variation dynamique de la taille du pore de fusion lors de l'exocytose. Ce processus UVR serait capable de déclencher des EPSCs multi-et monophasiques d'amplitudes et de formes équivalentes à ceux observés par l'équipe d'Elisabeth Glowatzky (**Fig. 22B** et **Fig. 22C**, partie basse; Chapochnikov *et al.*, 2014). Même si cette étude repose principalement sur des modèles mathématiques, elle apporte une nouvelle vision quant au mécanisme de fusion vésiculaire que pourraient utiliser les CCI. Ce mode UVR permettrait de garder un stock constant de vésicules proches des sites de fusion et donc d'éviter un épuisement vésiculaire lors de stimulations hautes fréquences. Il est à noter que cette étude repose simplement sur des enregistrements de l'activité spontanée des fibres afférentes. La coexistence des modes UVR et MVR n'est cependant pas à exclure. On peut imaginer que le mode MVR se mette essentiellement en place pour des niveaux de dépolarisation de grandes amplitudes et que le mode UVR concerne simplement la fusion vésiculaire spontanée.

**Question 2: Les CCI utilisent-elles un mode de fusion uni- et/ou multi-vésiculaire pour encoder le potentiel microphonique ?**



### Figure 22: Fusion multi-vésiculaire (MVR)- ou fusion uni-vésiculaire (UVR) ?

Les courants post-synaptiques excitateurs (EPSCs) peuvent suivre deux décours, un monophasique (B) ou un multiphasique (D). Pour expliquer ces deux types d'EPSCs, deux modèles ont été proposés: Le premier repose sur la fusion synchronisée de plusieurs vésicules, c'est le MVR. Dans ce modèle, l'amplitude des EPSCs monophasiques est contrôlée par la fusion synchronisée d'un plus ou moins grand nombre de vésicules (A, partie haute). En fonction de l'aspect synchrone de la fusion (C, partie haute), les EPSCs suivent un décours multiphasique avec plus ou moins d'événements (D). Le second modèle repose sur la fusion d'une seule vésicule, c'est l'UVR. Dans ce modèle, l'amplitude des EPSCs monophasiques est contrôlée par la taille du pore de fusion s'établissant entre les membranes vésiculaire et plasmique (A, partie basse). La cinétique de l'ouverture de ce pore ainsi que sa dynamique (C, partie basse), c'est-à-dire la possibilité de revenir à un état plus ou moins fermé peuvent aussi générer des EPSCs multiphasiques dont le nombre d'événements varie en fonction de cette dynamique. (EPSCs: Chapochnikov *et al.*, 2015).

## 9. L'endocytose des cellules ciliées sensorielles

Les cellules ciliées ont la propriété remarquable de pouvoir soutenir, indéfiniment sans épuisement, des vitesses d'exocytose extrêmement élevées au-delà de 12500 vésicules/s (Johnson *et al.*, 2005). Cet ajout massif de membrane vésiculaire à la ZA doit être rapidement compensé par un processus d'endocytose rapide et efficace.

L'endocytose est un processus ubiquitaire pour la capture de nutriments mais aussi pour le recyclage de protéines membranaires et la clairance des sites de fusion. Cette clairance permet l'élimination de l'ensemble des partenaires protéiques impliqués dans le déclenchement de l'exocytose telles que les protéines SNARE, pour éviter un encombrement des sites de fusion et le ralentissement de l'exocytose. Le mécanisme d'endocytose le plus généralement utilisé est celui médiée par la clathrine. Des vésicules présentant un manteau (« coated vesicles »), sur lequel s'organise la clathrine, ont été identifiées pour la première fois en 1975 par Barbara Pearse en microscopie électronique (Pearse, 1975; Pearse, 1976). L'endocytose dépendante de la clathrine impliquerait au moins six grandes classes de protéines (voir revue: McMahon and Boucrot, 2011). Parmi ces protéines, on trouve notamment la protéine adaptatrice 2 (AP-2) permettant de recruter les partenaires protéiques impliqués dans ce type d'endocytose, dont la dynamine. Cette dernière, hydrolysant le GTP, est impliquée dans l'étape de fission membranaire entre la vésicule et la membrane plasmique (Voir revue: Ferguson and De Camilli, 2012).

L'étude par la technique de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse a aussi mis en évidence l'expression de protéine AP-2 (protéine adaptatrice 2) dans les CCI's suggérant la possibilité d'une endocytose médiée par la clathrine (Duncker *et al.*, 2013). De plus, il a été montré que l'AP-2 interagit avec l'otoferline, le senseur calcique présumé des cellules ciliées sensorielles. Cependant, l'otoferline ne serait pas directement impliquée dans les mécanismes d'endocytose des CCI's (Neef *et al.*, 2014).

L'endocytose dépendante de la clathrine apparaît comme un processus relativement lent (~ 20 s; Watanabe *et al.*, 2013) comparée aux cinétiques d'exocytose des CCI's (Moser and Beutner, 2000; Beutner *et al.*, 2011). Ainsi il est difficile d'envisager qu'un tel mécanisme à lui seul, puisse être mis en place pour compenser l'exocytose rapide et massive des CCI's. Un autre mécanisme d'endocytose a été suggéré afin de répondre en partie à ce problème. Celui-ci consiste en une invagination massive (d'où le terme « bulk » en anglais) de la membrane plasmique sous la forme de citerne à partir desquelles serait ensuite formées de nouvelles vésicules (Fried and Blaustein, 1978). Un tel mécanisme a été montré dans plusieurs types cellulaires et notamment dans les cellules bipolaires de la rétine (Holt *et al.*, 2003) et plus récemment dans les CCI's (Neef *et al.*, 2014). Un troisième mécanisme d'endocytose, qualifiée d'ultra-rapide, a pu être visualisé dans des neurones hippocampiques en culture (Watanabe *et al.*, 2013). L'endocytose de ces neurones exprimant la protéine channel-rhodopsine 2 a pu, par des techniques de stimulation lumineuse et de « rapid-freezing », être montrée comme pouvant suivre des cycles de quelques dizaines de ms. Cette endocytose est à la fois dépendante du cytosquelette d'actine et de la dynamine. Néanmoins, celle-ci reste encore trop lente par rapport à la demande de recyclage vésiculaire des CCI's.

Les mécanismes moléculaires de l'endocytose rapide des cellules ciliées restent encore à déterminer. Au niveau de la rétine, il apparaît que les cônes et les bâtonnets utilisent des mécanismes d'endocytose différents. En effet, seule l'endocytose des bâtonnets est sensible au dynasore, un inhibiteur de la dynamine clathrine (Van Hook and Thoreson, 2012).

En plus de connaître les mécanismes moléculaires contrôlant le processus d'endocytose des cellules ciliées, il reste à connaître la localisation des sites d'endocytose. Il est facile de concevoir que les sites les plus efficaces, permettant à la cellule de conserver une fréquence d'exocytose de plusieurs centaines d'hertz, doivent être localisés suffisamment proches des sites de fusions pour limiter la diffusion des vésicules. Ceci est en accord avec l'observation de « bulk » endosome dans un rayon d'environ 200 nm autour des zones actives. Cependant, certaines études ont montré la présence de phénomène d'endocytose dans la partie apicale, sous la plaque cuticulaire des cellules ciliées auditives du poisson zèbre (Seiler and Nicolson, 1999) et des cellules vestibulaires des grenouilles (Kachar *et al.*, 1997). Il est difficile de concevoir que cette endocytose puisse participer au ravitaillement vésiculaire des zones actives synaptiques localisées à plusieurs dizaines de microns. Le rôle de cette endocytose apicale extra-synaptique pourrait impliquer un site d'échange important entre le compartiment endolymphatique et la partie baso-latérale des cellules ciliées.



## 10. Les senseurs calciques: la « gâchette » de l'exocytose

### 10.1 Les synaptotagmines

C'est au début des années 1990 que le  $\text{Ca}^{2+}$  a été montré comme un élément clé, accélérant la cinétique de l'exocytose des vésicules pré-synaptiques dans les neurones, par leur fixation sur des protéines appelées senseurs calciques. Il a été montré par des techniques biochimiques et génétiques que les synaptotagmines (Syt), protéines vésiculaires hautement conservées entre les espèces et les synapses, sont impliquées dans la transmission synaptique dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  (Littleton et al., 1993). La famille des synaptotagmines se compose de seize membres (Gauthier and Wollheim, 2008) subdivisée en deux sous familles en fonction de leur capacité à fixer plus ou moins efficacement le  $\text{Ca}^{2+}$ .

Syt fixant le $\text{Ca}^{2+}$	Syt ne fixant pas le $\text{Ca}^{2+}$
Syt I, II, III, V, VI, VII, IX, X	Syt IV, VIII, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI

Les synaptotagmines peuvent aussi être classées en fonction de la séquence de leur ARN messenger et de leur localisation cellulaire. Ainsi, six classes sont apparues (Südhof, 2002). Parmi les quinze synaptotagmines, seules syt I, syt II (classe 1) et syt 9 (classe 5) sont exprimées dans la membrane des vésicules pré-synaptiques (Hudson Birnbaum, 1995). La classe 2 (Syt VII) et la classe 3 (syt III, V, VI et X) sont exprimées dans la membrane plasmique.

L'ensemble des synaptotagmines possède deux domaines riches en résidus aspartate et sérine fixant le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, appelés domaine  $\text{C}_2$  (**Fig. 23A**). Ces domaines portent leur nom en raison de leur homologie avec une séquence de la protéine kinase C (Coussens *et al.*, 1986). Les domaines  $\text{C}_2$  procurent une affinité calcique particulière aux synaptotagmines. Chaque synaptotagmine possède un domaine  $\text{C}_2\text{A}$  et un domaine  $\text{C}_2\text{B}$ . En fonction de la présence ou non des résidus aspartate et sérine, l'affinité des domaines  $\text{C}_2\text{A}$  et  $\text{C}_2\text{B}$  pour le  $\text{Ca}^{2+}$  varie, conférant une affinité calcique différente aux synaptotagmines (**Fig. 23A**). Il est à noter que syt I et syt II, les senseurs calciques majoritairement impliqués dans l'exocytose vésiculaire rapide du système nerveux central possèdent une affinité calcique relativement faible d'environ 70  $\mu\text{M}$ . Leur affinité est 10 à 20 fois plus faible que les classes 2 et 3 (Südhof, 2002). L'analyse structurale de ces protéines et la présence de ces domaines particuliers capables de fixer le  $\text{Ca}^{2+}$  a permis de démontrer le rôle important des synaptotagmines en tant que senseurs calciques, aussi bien dans le système nerveux central (Geppert *et al.*, 1994; Südhof, 2002; Chapman 2002) qu'au niveau périphérique. En effet, pour ne citer que quelques exemples, les synaptotagmines déclenchent l'exocytose des vésicules à acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire des motoneurones (Littleton *et al.*, 1993), mais aussi dans la libération de l'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans (Gauthier and Wollheim, 2008) et dans l'exocytose des cellules ciliées du système auditif aux stades immatures du développement (Beurg *et al.*, 2010).

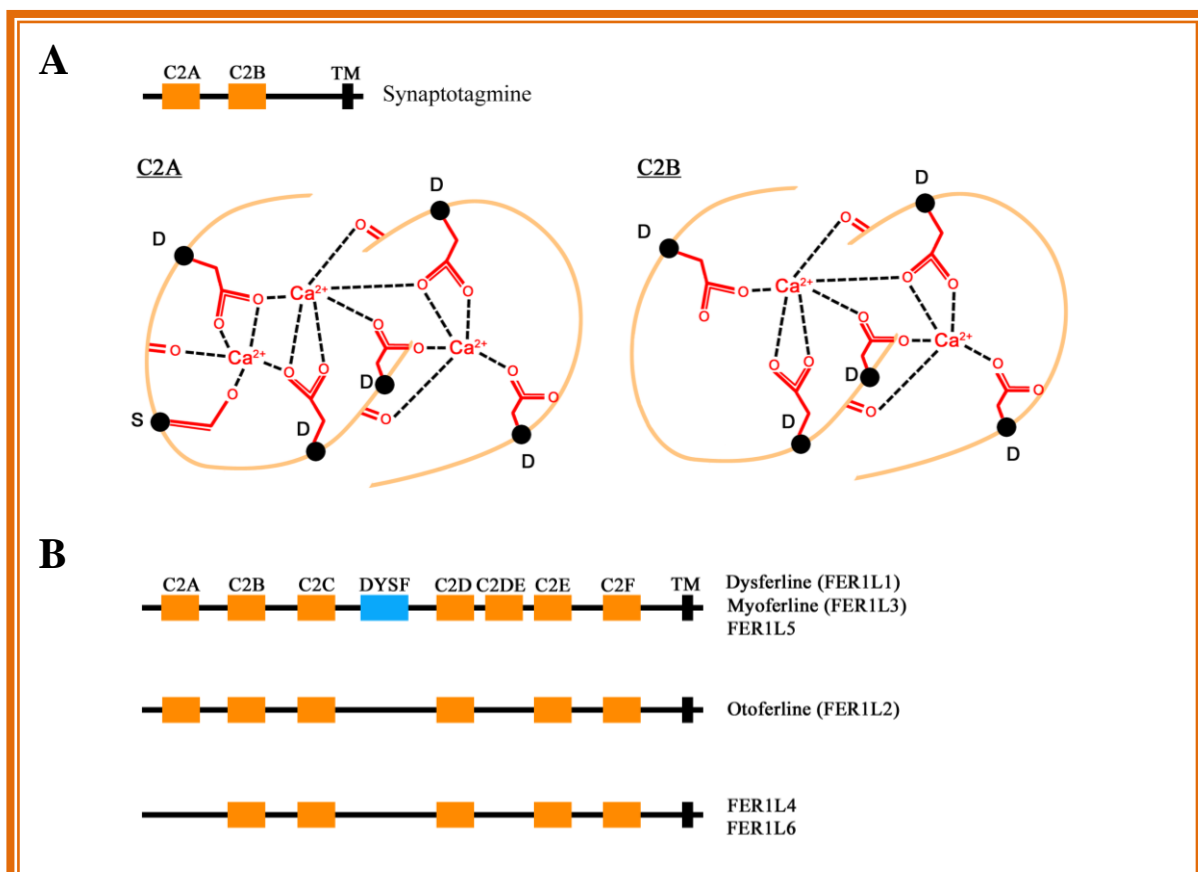
### 10.2 Les ferlines

Les ferlines sont des protéines exprimées par l'ensemble des eucaryotes, aussi bien dans les organismes les plus simples comme le nématode (*Caenorhabditis elegans*) que dans les organismes les plus complexes tels que les mammifères. Le premier membre de la famille des ferline (Fer-1) a été identifié chez le nématode en étudiant la dépendance au  $\text{Ca}^{2+}$  du processus de spermatogénèse (Achanzar and Ward, 1997). Les protéines appartenant à cette famille sont caractérisées par la présence d'un domaine transmembranaire permettant leur insertion dans les membranes lipidiques.



Les études portant sur les rôles des ferlines, par l'introduction de mutations, ont permis de mettre en évidence leur implication dans la fusion vésiculaire dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , le trafic membranaire et la réparation de la membrane plasmique (Achanzar and Ward, 1997; Washington and Ward, 2006; Krajacic *et al.*, 2009; Bansal *et al.*, 2003; Lek *et al.*, 2013; Redpath *et al.*, 2014). Les ferlines se distinguent en deux grandes familles en fonction de la présence ou l'absence du domaine DYSF (Lek *et al.*, 2010). Ce dernier est un domaine riche en résidus aromatiques dont le rôle n'a pas encore été clairement identifié. Cependant, il pourrait jouer le rôle de signal de localisation nucléaire (Therrien *et al.*, 2006). Chez l'Homme, il existe six protéines identifiées comme appartenant à cette famille (**Fig. 23B**):

- La dysferline (FER1L1) impliquée dans la réparation membranaire dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  des cellules musculaires.
- L'otoferline (FER1L2) impliquée dans l'exocytose dans cellules ciliées auditives et vestibulaires.
- La myoferline (FER1L3) impliquée dans la formation des myofibres pendant leur développement.
- FER1L4, FER1L5 et FER1L6 dont l'expression tissulaire et le rôle ne sont pas encore connus.



### Figure 23: Les synaptotagmines et les ferlines

(A) En haut, une représentation simplifiée de la synaptotagmine avec ses domaines C<sub>2</sub>A et C<sub>2</sub>B. En bas, l'organisation moléculaire des domaines C<sub>2</sub>A et C<sub>2</sub>B montrant les résidus aspartates (D) et sérines (S) impliqués dans la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Adaptée depuis Südhof, 2002). (B) Les six protéines de la famille des ferlines (FER1) exprimées par les mammifères, comprenant le senseur calcique présumé des cellules ciliées : l'otoferline (FER1L2). TM: Segment transmembranaire. Le domaine DYSF serait un signal de localisation nucléaire.

### 10.3 Les senseurs calciques des cellules sensorielles

#### a. Les photorécepteurs et les cellules bipolaires

De nombreuses études suggèrent que le senseur calcique impliqué dans l'exocytose des cellules sensorielles de la rétine des mammifères serait Syt I (Bernston and Morgans, 2003; Mercer and Thoreson, 2011). Syt II semble être absente des synapses à ruban des photorécepteurs et des cellules bipolaires chez les vertébrés (Fox and Sanes, 2007). Cependant, aucune étude à ce jour ne s'est encore intéressée à l'exocytose dépendante de ces deux senseurs calciques, notamment dans des modèles animaux mutés pour Syt I et/ou Syt II, dans le but de confirmer le rôle de ces deux protéines dans la régulation de l'exocytose des cellules sensorielles de la rétine.

#### b. L'otoferline: le senseur calcique des cellules ciliées ?

Contrairement aux synapses centrales, les cellules ciliées matures auditives et vestibulaires n'expriment pas et n'utilisent pas les synaptotagmines comme senseur calcique (Safieddine and Wenthold, 1999; Beurg *et al.*, 2010; Safieddine *et al.*, 2012).

Des études du génome de quatre familles libanaises atteintes de surdité profonde ont mis en évidence la présence d'une mutation non-sens sur le gène codant pour la protéine otoferline (Yasunaga *et al.*, 1999; Yasunaga *et al.*, 2000). Les mutations touchant le gène de l'otoferline sont à l'origine de la surdité autosomique récessive DFNB9. Cette protéine exprime l'ensemble des domaines caractéristiques de la famille des ferlines à l'exception de leur domaine Dysf (**Fig. 23B**). Chez l'Homme, deux isoformes de l'otoferline ont été identifiées. On distingue ainsi l'isoforme courte d'environ 1230 acides aminés à trois domaines C<sub>2</sub> et l'isoforme longue de 1997 acides aminés à six domaines C<sub>2</sub> (Yasunaga *et al.*, 2000; Roux *et al.*, 2006). Mais il apparaît que seules les mutations touchant l'isoforme longue sont à l'origine de la surdité DFNB9. Chez la souris, seule l'isoforme longue a été trouvée (Yasunaga *et al.*, 2000).

Pour comprendre le rôle de l'otoferline dans le système auditif et vestibulaire, l'équipe de Christine Petit à l'Institut Pasteur à Paris a généré un modèle murin avec le gène OTOF inactivé (Roux *et al.*, 2006). Ces souris présentent une surdité profonde et les études électrophysiologiques associées à l'imagerie confocale et électronique ont révélé que l'exocytose des CCI et des cellules ciliées utriculaires est fortement diminuée et ralentie. Cependant l'otoferline ne semble pas être impliquée dans la mise en place et le maintien des zones actives des CCI (Roux *et al.*, 2006 ; Beurg *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2014) et des cellules ciliées utriculaires (Dulon *et al.*, 2009). Par la suite, de nombreuses études ont permis de mieux comprendre le rôle de l'otoferline dans la transmission synaptique des cellules ciliées sensorielles. Notre équipe a montré que, chez la souris, l'exocytose dépendante de l'otoferline se met en place à partir du septième jour après la naissance (P7). Avant cet âge, l'exocytose apparaît dépendante des senseurs calciques Syt I et Syt II (Beurg *et al.*, 2010; voir revue: Safieddine *et al.*, 2012).

Une équipe anglaise a aussi mis en évidence le rôle de la synaptotagmine IV dans la linéarisation de la dépendance au Ca<sup>2+</sup> de l'exocytose (Johnson *et al.*, 2010). Il a aussi été montré que cette linéarisation dépendrait de l'expression correcte du canal potassique SK2 dans la membrane des CCI pendant la maturation de l'organe auditif (Johnson *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2013). Néanmoins, les mécanismes moléculaires à l'origine de cette linéarisation sont encore mal compris.

La présence de six domaines C2, dont cinq présentant des sites capables de fixer les ions  $\text{Ca}^{2+}$ , suggère que l'otoferline est une protéine capable d'interagir avec les phospholipides membranaires et de produire de grandes modifications conformationnelles  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes. L'étude de la fusion membranaire par la reconstitution de liposome *in vitro*, montre que l'otoferline accélère la fusion vésiculaire dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  et que son domaine C<sub>2</sub>A ne fixe pas le  $\text{Ca}^{2+}$  (Johnson and Chapman, 2010). L'affinité calcique de l'otoferline a été mesurée entre 13 et 25  $\mu\text{M}$ . L'otoferline serait donc vingt fois plus sensible aux variations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire que Syt I et Syt II.

**Question 3: Quelle est l'affinité calcique réelle de l'otoferline, *in vivo*, dans les cellules sensorielles auditives et vestibulaires ?**

Des expériences de biologie moléculaire visant à étudier les partenaires protéiques de l'otoferline ont permis de mettre en évidence qu'elle peut fixer, via ses domaines C<sub>2</sub>, le complexe t-SNARE (syntaxine 1a et la protéine SNAP-25; Ramakrishnan *et al.*, 2009) et que cette interaction est régulée par le  $\text{Ca}^{2+}$  (Ramakrishnan *et al.*, 2014). Un modèle moléculaire a été proposé pour expliquer l'interaction entre l'otoferline et les protéines t-SNARE. La faible concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire favoriserait l'interaction des domaines C<sub>2</sub> entre-eux. Lors de la dépolarisation des cellules ciliées, l'élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire au niveau des sites de fusion déclencherait un changement conformationnel de l'otoferline, lui permettant d'interagir avec les protéines t-SNARE et faciliter la fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane plasmique (Ramakrishnan *et al.*, 2014).

De plus l'otoferline serait aussi capable de fixer la boucle intracellulaire entre les domaines II et III de la sous-unité  $\alpha 1\text{D}$  du canal calcique Cav1.3 via son domaine C<sub>2</sub>D (Ramakrishnan *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent donc un rôle très important de l'otoferline dans l'organisation et la régulation de l'exocytose des cellules ciliées. L'interaction de l'otoferline avec le canal calcique Cav1.3 suggère aussi que celle-ci pourrait être impliquée dans l'agrégation progressive des canaux calciques aux sites de fusion, observée pendant la maturation des cellules ciliées (Wong *et al.*, 2014 ; Rutherford, 2015), participant à la meilleure efficacité calcique de l'exocytose observée aux stades matures (Johnson *et al.*, 2005). En raison de 1) son appartenance à la famille des ferlines, 2) sa forte homologie de séquence avec les synaptotagmines, 3) sa capacité à fixer le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et 4) l'abolition de l'exocytose lorsqu'elle est absente, l'otoferline a été proposée comme le senseur calcique potentiel des cellules ciliées.

Des études par la technique d'hybridation *in situ* ont mis en évidence l'expression tissulaire de l'otoferline. Bien qu'elle soit majoritairement exprimée dans la cochlée et le vestibule, l'otoferline est aussi retrouvée dans de nombreuses structures cérébrales tels que le cervelet, le cortex et l'hippocampe (Schug *et al.*, 2006), mais son rôle n'est pas encore connu.

Très récemment, une équipe américaine travaillant sur l'audition du poisson zèbre, a réussi à faire ré-exprimer différentes parties de l'otoferline dans les cellules ciliées, par la micro-injection de vecteurs plasmidiques au stade embryonnaire (Chatterjee *et al.*, 2015). La micro-injection de ces vecteurs contenant la séquence codant toute ou une partie de l'otoferline dans des poissons zèbres n'exprimant plus l'otoferline, a permis de récupérer les fonctions auditive et vestibulaire.

Nous verrons dans la partie "résultats" (article 5) de ma thèse, que l'injection de vecteurs viraux à travers la fenêtre ronde de la cochlée des souris déficiente pour la clarine 1, à l'origine du syndrome d'Usher III, a permis de restaurer une partie de la fonction auditive. Cette technique de restauration de fonction consiste à utiliser les virus associés aux adénovirus (AAV) portant la séquence codante correcte du gène muté, sous la dépendance d'un promoteur spécifique des cellules ciliées. Cette technique permet de transférer efficacement plus de 90 % des cellules ciliées lorsque les virus sont injectés à P2-P3 à travers la fenêtre ronde. Cependant, l'utilisation de cette technique pour restaurer la fonction de l'otoferline dans les souris mutées, reste difficile en raison de la taille importante de l'otoferline (200 kDa soit environ 1999 acides aminés).

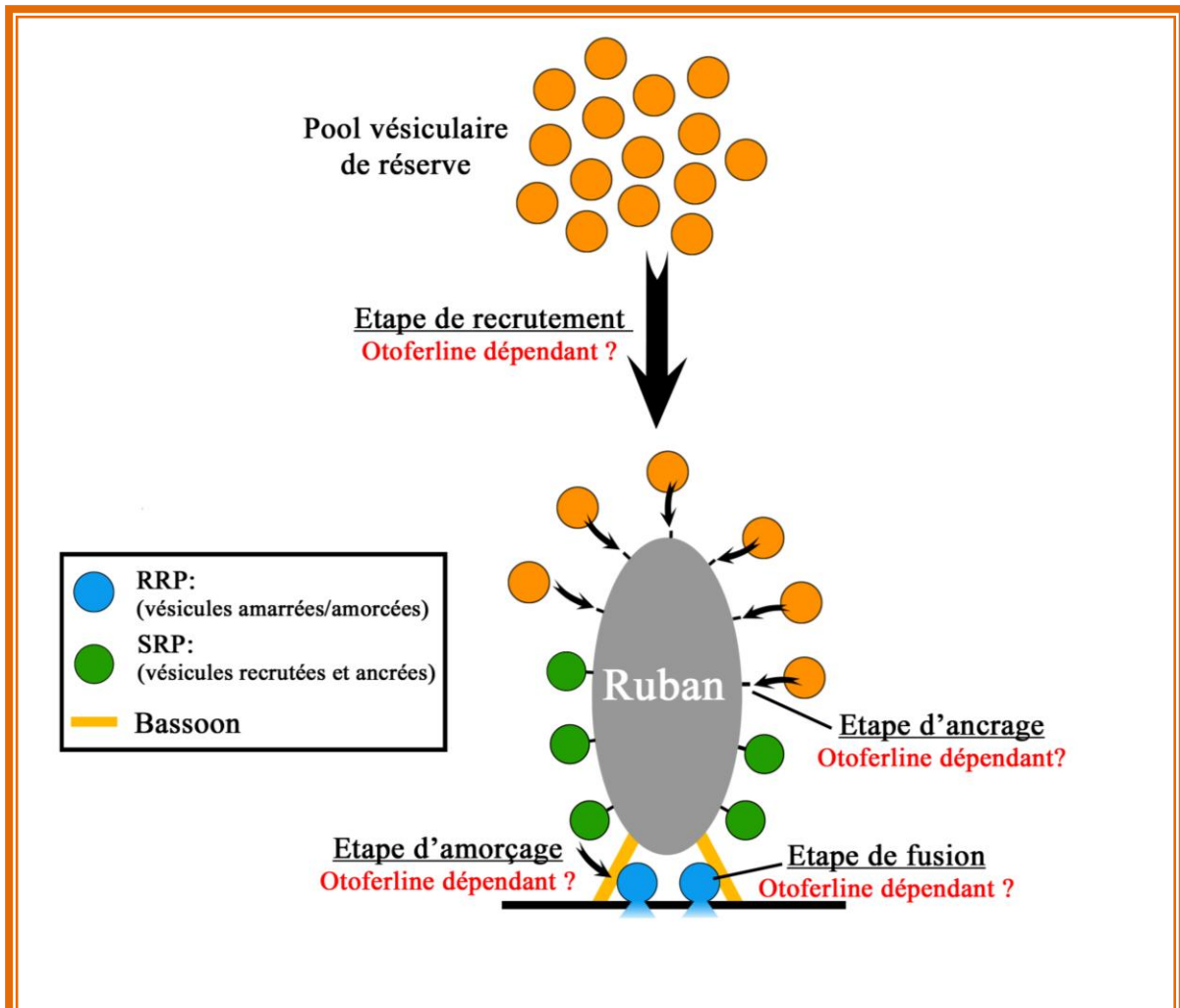
#### 10.4 Quelles sont les étapes de l'exocytose contrôlées par l'otoferline ?

L'otoferline est essentielle pour l'exocytose des cellules ciliées auditives et vestibulaires. Les étapes du cycle vésiculaire régulées par l'otoferline restent encore à déterminer. L'otoferline contrôle-t-elle le ravitaillement vésiculaire aux zones actives, et/ou agit-elle dans les étapes finales de la fusion, c'est-à-dire l'arrimage (« docking ») et l'amorçage (« priming ») des vésicules à la membrane ? (**Fig. 24**) L'équipe de Tobias Moser a apporté un début de réponse en étudiant le modèle murin *pachanga* dans lequel le niveau d'expression de l'otoferline est diminué (Pangrisc *et al.*, 2010). Ils ont montré que l'exocytose rapide du RRP (**Fig. 24**) est conservée mais que l'exocytose déclenchée par de longues dépolarisations et donc mobilisant des vésicules localisées à de plus grandes distances des canaux calciques est fortement diminuée suggérant que l'otoferline serait impliquée dans la régulation du ravitaillement vésiculaire.

L'équipe de Christine Petit a aussi généré un modèle murin sourd dans lequel l'otoferline est couplée à la protéine fluorescente GFP dans sa partie C-terminale. Cette partie C-terminale de l'otoferline se trouverait ancrée dans la partie intra-vésiculaire alors que la partie N-terminale et ses six domaines C2 flotterait dans le cytoplasme. Les CCI de souris *Otof-GFP* montrent un ralentissement de la fusion du RRP et une abolition du recrutement vésiculaire associés à une diminution de l'amplitude des courants calciques. Les analyses par la technique de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) montrent que la mobilité vésiculaire n'est pas affectée. De même, la visualisation des zones actives des CCI, par la microscopie électronique, a montré que le nombre de vésicules associées aux rubans n'est pas affecté. Ces résultats suggèrent que le ralentissement de l'exocytose n'est pas lié à un défaut de ravitaillement vésiculaire (**résultats non publiés**). Une de nos hypothèses pour expliquer ce phénotype est qu'une des étapes finales du processus de fusion serait contrôlée par l'otoferline. Ce phénotype rappelle notamment celui observé dans les cellules bipolaires de la rétine, lorsque celles-ci sont dialysées avec de l'ATP<sub>γ</sub>S, homologue non hydrolysable de l'ATP (Heidelberger *et al.*, 2002). En effet, cette étude montre que le nombre de vésicules autour du ruban est conservé mais postule que l'étape d'ancrage des vésicules sur le ruban est ralentie, provoquant un ralentissement global de la fusion vésiculaire. Il est possible que l'otoferline puisse être aussi impliquée dans l'étape d'ancrage des vésicules au ruban. Il ressort donc que l'otoferline pourrait jouer plusieurs rôles dans les CCI: 1) la régulation d'une ou plusieurs étapes finales de la fusion (amarrage et/ou amorçage; Roux *et al.*, 2006), 2) le ravitaillement vésiculaire au niveau de l'ensemble des ZAs (Pangrisc *et al.*, 2010), 3) le contrôle de l'ancrage des vésicules au ruban et 4) endocytose lente dépendante de la clathrine (Duncker *et al.*, 2013).

Cependant, ces différents points restent des hypothèses soulevant alors la question suivante:

**Question 4: Quel est le rôle précis de l'otoférline dans la transmission synaptique des cellules ciliées sensorielles ?**



**Figure 24: L'otoférline dans l'exocytose synaptique des CCI**

On peut distinguer quatre grandes étapes dans le processus d'exocytose des CCI. Le recrutement, l'ancrage, l'amorçage et la fusion des vésicules. Ainsi différents pools vésiculaires ont été identifiés: 1) les vésicules amarrées et prêtent à fusionner constituant le RRP (Readily Releasable Pool, vésicules bleues); 2) les vésicules recrutées formant le SRP (Slowly Releasable Pool, vésicules vertes) et 3) les vésicules constituant le pool de réserve lointain (vésicules orange).

## 11. Les canaux calciques voltage-dépendants

Le  $\text{Ca}^{2+}$  est un second messager universel permettant de contrôler un ensemble de processus tels que l'expression des gènes, la contraction musculaire par le mécanisme du «  $\text{Ca}^{2+}$  Induced  $\text{Ca}^{2+}$  Release » (CICR), le contrôle de la phosphorylation de certaines protéines, l'initiation de l'apoptose et le relargage de neurotransmetteurs tel que le glutamate dans le cas des cellules ciliées sensorielles auditives et visuelles. L'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants peut être déclenchée 1) par un potentiel d'action au niveau des neurones, 2) par le potentiel récepteur (microphonique) des cellules ciliées auditives et vestibulaires, 3) par l'inactivation du courant d'obscurité des photorécepteurs, lié à la fermeture des canaux sodiques dépendants du GMPc. La dépolarisation de la membrane cellulaire et l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule permet, via les senseurs calciques, de déclencher l'exocytose.

### 11.1 La famille des canaux calciques voltage-dépendant

Il existe dix isoformes de canaux calciques nommées en fonction de leur sous-unité  $\alpha 1$  et codées par des gènes différents. Les canaux calciques sont classés en fonction de leurs propriétés biophysiques: seuil et vitesse d'activation/inactivation, conductance ionique et sensibilité à certaines molécules pharmacologiques. Ces différentes propriétés proviennent en grande partie du type de sous-unité  $\alpha 1$  formant le pore du canal calcique. On distingue ainsi cinq grandes sous-familles de canaux calciques, les familles L, P, Q, N, R et T (Budde *et al.*, 2002; Catterall, 2011; Striessnig *et al.*, 2014). Alors que les familles P, Q, N et R sont majoritairement retrouvées dans les membranes neuronales, les familles L et T ont une distribution plus ubiquitaire. Les canaux T sont exprimés aussi bien dans les neurones (Cain and Snutch, 2010) que dans les cellules pacemaker cardiaques (Burgess *et al.*, 2002) mais aussi dans les cellules ciliées auditives du poulet (Levic *et al.*, 2007; Nie *et al.*, 2008). Les canaux calciques de type L ont une distribution très large, en plus de leur expression dans les neurones, on les retrouve dans l'ensemble du tissu cardiaque (Platzer *et al.*, 2000), à la fois dans les tissus conducteurs et musculaires où ils sont impliqués dans la genèse du potentiel d'action au niveau du nœud sinusal, mais aussi dans la contraction musculaire des cellules atriales et ventriculaires. Ils sont aussi présents dans la membrane des tubules T des muscles squelettiques permettant d'initier la contraction musculaire suite au relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du réticulum sarcoplasmique via le mécanisme du CICR. Ces canaux sont aussi très exprimés dans les cellules ciliées auditives (Platzer *et al.*, 2000; Brand *et al.*, 2003) et vestibulaires (Dou *et al.*, 2004) et dans les photorécepteurs (Koschak *et al.*, 2003; Griessmeier *et al.*, 2009; Shaltiel *et al.*, 2012). Les canaux calciques sont aussi classés en deux grands groupes en fonction de leur seuil d'activation. Ainsi les canaux calciques de type T s'activant à des potentiels très négatifs entre -100 et -90 mV (Cain and Snutch, 2010) sont considérés comme des canaux s'activant à bas voltage (« low voltage activated channel ou LVA »). Les quatre autres familles de canaux calciques ont un seuil d'activation plus positif situés autour de -50 mV et sont considérés comme des canaux s'activant à haut voltage (« high voltage activated channels ou HVA »).

### 11.2 Structure moléculaire des canaux calciques

#### a. La sous-unité $\alpha 1$

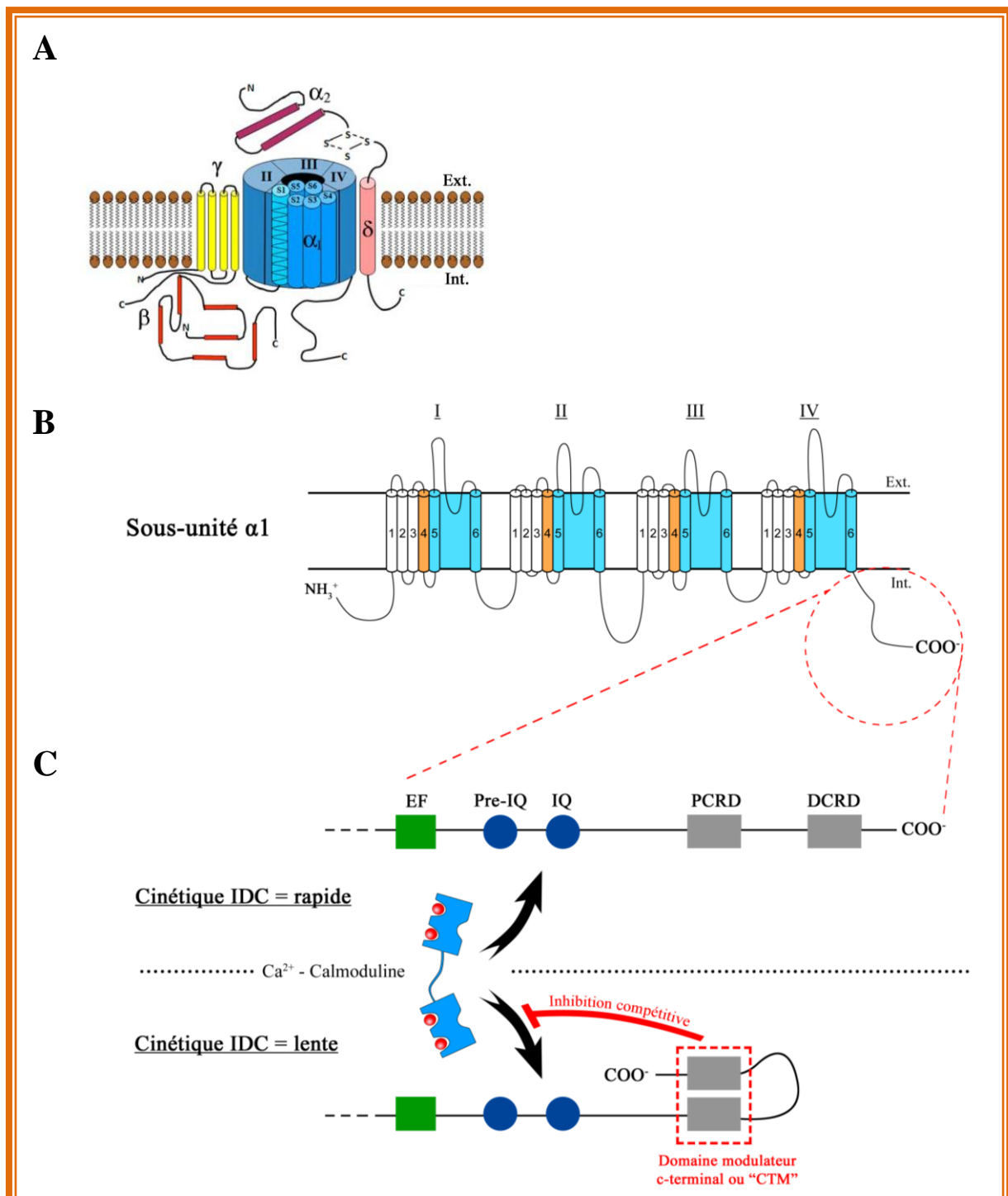
Les canaux calciques sont des protéines hétéro-pentamériques, c'est-à-dire composés de cinq sous-unités différentes (Curtis and Catterall, 1984). La plus grande de ces sous-unités est la sous-unité  $\alpha 1$  dont le poids moléculaire est d'environ 190 kDa (soit environ 1900 acides aminés). Cette sous-unité a une taille très proche de celle de l'otoferline (200 kDa).

Il existe dix isoformes pour la sous-unité  $\alpha 1$ , chacune confère des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques spécifiques au canal calcique. La sous-unité  $\alpha 1$  constitue le pore du canal et participe à la sélectivité ionique de celui-ci. Sa structure moléculaire est très proche de celle des canaux sodiques (Tanabe *et al.* 1987). Elle est composée de 4 domaines (I, II, III, IV) de six segments transmembranaires (S1 à S6) (**Fig. 22A et 22B**). Comme pour les canaux sodiques, les segments S5 et S6 des quatre domaines se mettent face à face formant la paroi du pore du canal et les segments S4 forment ce que l'on appelle les « voltage sensors » en raison de la présence de nombreuses acides aminés chargés positivement, sensibles aux variations de voltage. Il a été montré que l'expression seule de cette sous-unité dans la membrane des fibres musculaires squelettiques est suffisante pour générer un courant calcique (Perez-Reyes *et al.* 1989). Néanmoins, le niveau d'expression du canal est très diminué et leurs propriétés électrophysiologiques (activation et inactivation en particulier) sont ralenties. La co-expression des sous-unités auxiliaires avec la sous-unité  $\alpha 1$  est donc importante pour réguler l'activité du canal calcique.

### b. Les sous-unités auxiliaires du canal calcique

Les quatre autres sous-unités participant à la formation du complexe canalaire sont des sous-unités auxiliaires régulatrices. Ce sont des sous-unités de faible poids moléculaires. On distingue la sous-unité  $\beta$ , elle fait environ 55 kDa et quatre isoformes de cette sous-unité ont été identifiées ( $\beta 1$  à  $\beta 4$ ). Contrairement à la sous-unité  $\alpha 1$  qui est strictement membranaire, celle-ci se trouve dans le milieu cytosolique et est reliée à la sous-unité  $\alpha 1$  via la boucle cytosolique entre les domaines I et II de cette dernière (Striessnig *et al.*, 2014). De nombreuses études sur le rôle de la sous-unité  $\beta$  ont révélé que cette dernière est importante dans la régulation du niveau d'expression du canal à la membrane, dans le contrôle des cinétiques d'activation et d'inactivation du canal ainsi que la dépendance au voltage du canal (Lacerda *et al.*, 1991; Singer *et al.* 1991). La troisième sous-unité est la sous-unité gamma ( $\gamma$ ), c'est la plus petite des cinq sous-unités, c'est une glycoprotéine de 4 segments transmembranaires d'environ 30 kDa (Takahashi *et al.* 1987). Le rôle de cette sous-unité n'est pas clairement défini puisque la co-expression de celle-ci avec la sous-unité  $\alpha 1$  n'a que très peu d'effet sur les propriétés biophysiques du canal. Les deux dernières sous-unités régulatrices sont les sous-unités alpha 2 ( $\alpha 2$ ) et delta ( $\delta$ ). Il a été montré que la sous-unité  $\delta$  est codée par la partie 3' de la séquence codant pour la sous-unité  $\alpha 2$ . Elles sont toutes les deux traduites ensemble et subissent un clivage protéolytique, et ensuite, par le biais de différentes maturations post-traductionnelles, ces deux sous-unités sont reliées par un pont disulfure. La sous-unité  $\alpha 2\delta$ , d'un poids moléculaire d'environ 170 kDa est localisée dans le compartiment extracellulaire. Son ancrage dans la membrane a fait l'objet de plusieurs études. Des études récentes postulent que l'ancrage de la sous-unité  $\alpha 2\delta$  ne passerait pas par un domaine transmembranaire comme le montre la figure 25A, mais par une liaison glycophosphatidylinositol (Davies *et al.*, 2010, voir revue: Dolphin, 2013). La co-expression de cette sous-unité avec la sous-unité  $\alpha 1$  a montré que son rôle est très proche de la sous-unité  $\beta$ . En effet, elle participerait à la régulation de l'expression de la sous-unité  $\alpha 1$  à la membrane et aussi la régulation des paramètres biophysiques du canal calcique mais avec un rôle moins significatif que celui de la sous-unité  $\beta$  (Arikkath and Campbell, 2003; Davies *et al.*, 2007).





**Figure 25: Représentation schématique du canal calcique (A)** Ensemble des sous-unités formant le complexe canalaire (Gurkoff et al., 2013). Il est à noter que l’ancrage de la sous-unité  $\alpha 2\delta$  reste encore à déterminer **(B)** La sous-unité  $\alpha 1$  est composée de 4 domaines (I à IV) formés par 6 segments transmembranaires (S1 à S6). Les segments S5 et S6 (en bleus) forment la paroi du canal calcique. Les segments S4 (orange) sont les senseurs du voltage. **(C)** La partie C-terminale de la sous-unité  $\alpha 1$  a été agrandie pour mettre en évidence les principaux domaines contrôlant la cinétique de l’inactivation dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  (IDC). Lorsque le domaine CTM est formé (encadré rouge) il rentre en compétition avec la liaison de la  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline sur les domaines pré-IQ et IQ, induisant le ralentissement de la cinétique d’inactivation.



### 11.3 L'inactivation des canaux calciques

#### a. L'inactivation dépendante du voltage

Les canaux calciques comme l'ensemble des canaux dépendants du voltage ont la propriété de s'inactiver en fonction du voltage (IDV). Ce processus est une propriété intrinsèque au canal et est médié par certains segments transmembranaires, certaines boucles cytosoliques composant la sous-unité  $\alpha 1$  mais aussi par la sous-unité  $\beta$  régulatrice. L'utilisation de canaux calciques chimériques, c'est-à-dire le remplacement de quelques acides aminés par d'autres provenant de différentes familles de canaux a permis de démontrer le rôle important des quatre segments S6 et de la boucle intra-cytosolique reliant les domaines I et II dans la régulation et le contrôle de la cinétique d'inactivation. (An and Zamponi, 2000).

#### b. L'inactivation dépendante du calcium

A côté de l'IDV, les canaux calciques possèdent la particularité de s'inactiver en fonction de la concentration intracellulaire calcique (IDC). Ce processus d'inactivation spécifique aux canaux calciques lui offre la possibilité de contrôler efficacement la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  entrant dans la cellule durant chaque stimulation. Le mécanisme de l'IDC est relativement commun à l'ensemble des cinq grandes familles de canaux calciques. C'est la partie C-terminale de la sous-unité  $\alpha 1$  qui est à l'origine de ce processus d'inactivation. En effet quand celle-ci est absente l'amplitude et la cinétique de l'IDC sont très largement augmentées (**Fig. 23B**).

La partie C-terminale des canaux calciques possède plusieurs domaines de régulation impliqués dans le contrôle de l'IDC (**Fig. 22B**). C'est la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire sur la calmoduline qui est l'origine de ce processus. La calmoduline est une protéine possédant quatre domaines chacun capable de fixer un ion  $\text{Ca}^{2+}$ . C'est suite à la fixation du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline sur les domaines pré IQ et IQ de la partie C-terminale que la cinétique de l'IDC est régulée (Peterson *et al.*, 1999; Qin *et al.*, 1999; Catterall, 2011; Erickson *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2010; Striessnig *et al.*, 2014). Il existe deux autres domaines importants localisés dans la partie C-terminale des canaux calciques. Il s'agit des domaines de régulation proximale (Proximal Carboxy terminal Regulatory Domain ou PCRD) et distale (Distal Carboxy terminal Regularatory Domain ou DCRD). Ces deux domaines de régulation en hélice alpha ont la particularité, en se liant l'un à l'autre, de former un complexe de modulation C-terminal (Carboxy Terminal Modulatory domain ou CTM) dont la structure tridimensionnelle (3D) est proche de la calmoduline le rendant capable de rentrer en compétition avec la fixation du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline sur les domaines pré IQ et IQ (Singh *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010, Striessnig *et al.*, 2014). En plus de ces différents domaines de régulation capables de diminuer la cinétique de l'IDC, les cellules expriment certaines protéines dont la structure 3D est aussi proche de celle de la calmoduline, ce sont les CaBPs (Calmodulinlike Binding Protein). Il existe cinq isoformes de CaBPs possédant quatre sites potentiels de fixation pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (Striessnig *et al.*, 2014). Ces protéines peuvent entrer en compétition avec la fixation de la calmoduline sur le domaine IQ (Ben Johny *et al.*, 2013). Leur rôle, en plus d'agir comme un tampon  $\text{Ca}^{2+}$ , est d'accélérer la cinétique de l'IDC ou bien la diminuer en fonction des isoformes considérées et de la partie N ou C terminale de la CaPB se fixant sur le domaine IQ de la sous-unité  $\alpha 1$ . Il a été montré que les CaBPs sont exprimées dans les CCI du poulet et de la souris (Lee *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2007; Uthaiyah and Hudspeth, 2010) et aussi dans les photorécepteurs (Haeseleer *et al.*, 2004) suggérant une régulation possible des canaux calciques par les CaBPs dans les cellules sensorielles auditives et visuelles.

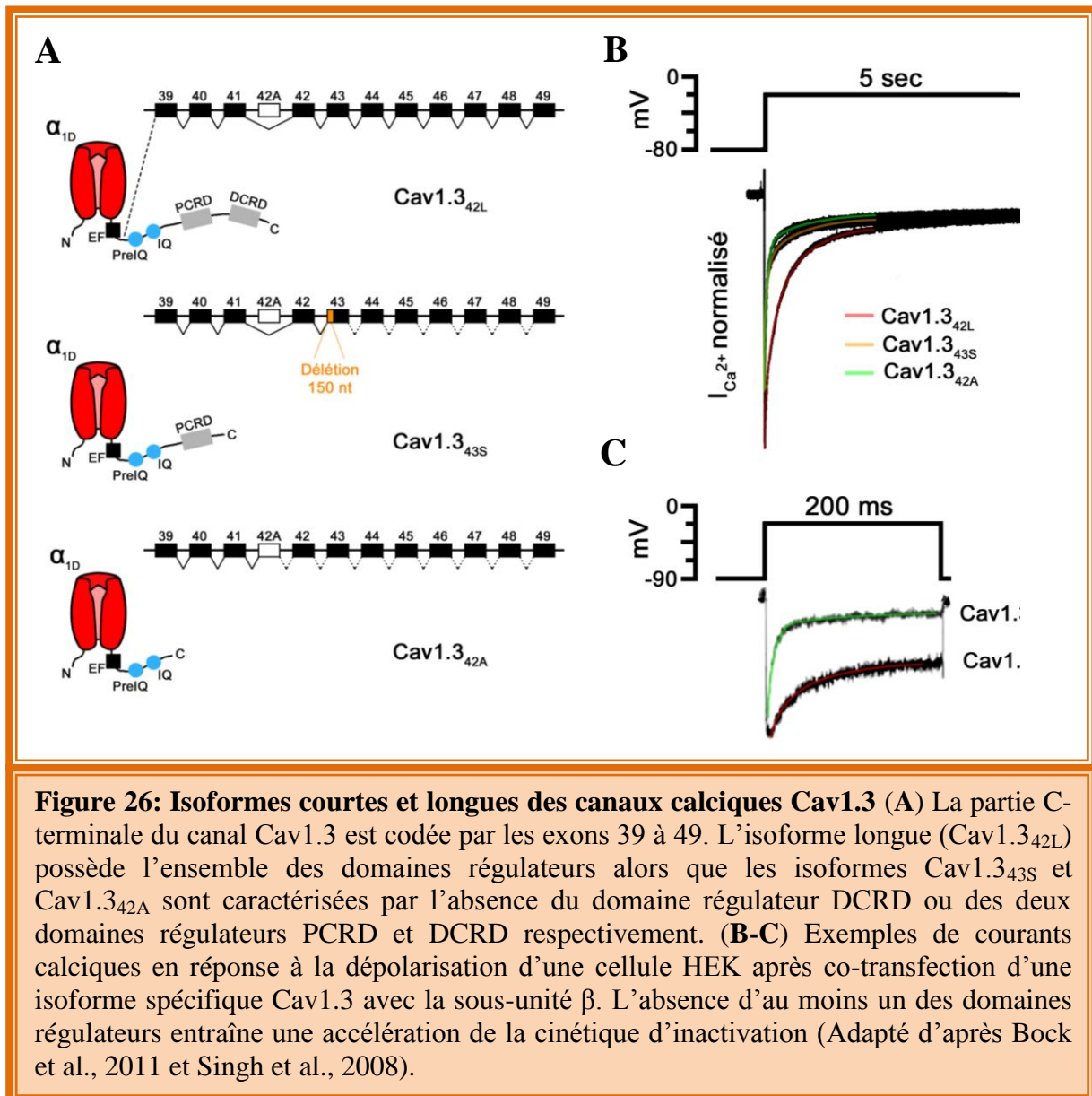
*c. L'inactivation dépendante des protons*

Les deux mécanismes d'inactivation cités ci-dessus, sont des mécanismes de régulation intrinsèque (IDV) et intracellulaire (IDC) du canal calcique. Le chargement des vésicules en glutamate nécessite une entrée massive de protons ( $H^+$ ) dans ces mêmes vésicules induisant une chute de pH intra-vésiculaire à environ 5,1 comparé au milieu extracellulaire compris généralement entre 7,3 et 7,4 (**voir chapitre 6.1: Mécanisme de chargement vésiculaire en glutamate**). Les protons libérés conjointement avec le glutamate lors de l'exocytose sont capables de se fixer sur le canal calcique entraînant un blocage transitoire du courant  $Ca^{2+}$  ( $I_{CaTB}$ ). Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer ce phénomène. Premièrement, les protons, en se fixant à la bouche du canal calcique (Zhou and Jones, 1996) entraînent une diminution de la conductance du canal (60-80%). Deuxièmement, la fixation des protons sur la membrane plasmique est capable de perturber sa polarisation à l'origine d'un décalage de seuil d'activation vers des potentiels moins négatifs (DeVries, 2001). Grâce à un tel mécanisme, le système est capable de réguler précisément l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans la cellule en contrôlant l'état d'activation/inactivation du canal à la fois depuis l'intérieur (IDV/IDC) et l'extérieur de la cellule ( $H^+$ ). L' $I_{CaTB}$  provoqué par les  $H^+$  a été mis en évidence au niveau des synapses à ruban des photorécepteurs, des cellules bipolaires et des cellules ciliées auditives des amphibiens (DeVries 2001; Palmer *et al.* 2003; Cho and von Gersdorff, 2014). Le rôle d'une telle régulation n'est pas clairement défini. Cependant il pourrait permettre d'exercer un rétrocontrôle négatif sur la libération de glutamate par les cellules pré-synaptiques, participant à limiter le phénomène d'excitotoxicité des fibres nerveuses post-synaptiques. L'excitotoxicité est liée à une activation excessive des récepteurs AMPA post-synaptiques entraînant un déséquilibre osmotique dans les fibres nerveuses par une entrée massive d'ions et d'eau conduisant à leur mort prématurée. L'excitotoxicité participerait aussi dans le processus de neurodégénérescences observées dans les maladies de Parkinson, Huntington *et alzheimer* (voir revue: Dong *et al.*, 2009). De même, l'excitotoxicité des fibres afférentes a été mise en cause dans les surdités liées à une exposition à des bruits d'une trop forte intensité et liées à l'âge (voir revue: Moser *et al.*, 2013).

**Question 5: Existe-t-il un tel mécanisme de régulation dans les cellules ciliées sensorielles des mammifères? Quel serait le rôle physiologique de cette régulation ?**

*d. Les isoformes courtes et longues des canaux calciques Cav1.3*

L'importance du rôle de la partie C-terminale des sous-unités  $\alpha 1$ , à la fois dans la régulation des paramètres biophysiques et le contrôle de l'IDC, a été mise en évidence par la détection des épissages alternatifs de la partie C-terminale du canal Cav1.3, à l'origine d'isoformes courtes dans lesquelles un ou plusieurs domaines régulateurs de la partie C-terminale sont absents. La co-expression de ces différentes isoformes  $\alpha 1$  avec la sous-unité régulatrice  $\beta$  dans les cellules HEK, a clairement montré une accélération de l'IDC en absence de ces domaines régulateurs mais aussi que la probabilité d'ouverture de ces isoformes courtes est augmentée (**Fig. 23**; Singh *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2011; Bock *et al.*, 2011; Scharinger *et al.*, 2015). Ces isoformes sont exprimées dans de nombreux tissus, tels que le cerveau, le pancréas, le cœur et l'organe de Corti. En 2013, une équipe de Singapour a démontré l'importance de la partie C-terminale dans la modulation de la sensibilité du canal Cav1.3 aux dihydropyridines, telle que la nifédipine (Huang *et al.*, 2013). Les dihydropyridines sont une familles de molécules pharmacologiques comprenant à la fois des agonistes (Brown *et al.*, 1984) et des antagonistes des canaux calciques de type L (nifédipine, nimodipine). Le rôle physiologique de ces différentes isoformes reste à déterminer.



**Figure 26: Isoformes courtes et longues des canaux calciques Cav1.3** (A) La partie C-terminale du canal Cav1.3 est codée par les exons 39 à 49. L'isoforme longue (Cav1.3<sub>42L</sub>) possède l'ensemble des domaines régulateurs alors que les isoformes Cav1.3<sub>43S</sub> et Cav1.3<sub>42A</sub> sont caractérisées par l'absence du domaine régulateur DCRD ou des deux domaines régulateurs PCRD et DCRD respectivement. (B-C) Exemples de courants calciques en réponse à la dépolarisation d'une cellule HEK après co-transfection d'une isoforme spécifique Cav1.3 avec la sous-unité  $\beta$ . L'absence d'au moins un des domaines régulateurs entraîne une accélération de la cinétique d'inactivation (Adapté d'après Bock et al., 2011 et Singh et al., 2008).

## 11.4 Les canaux calciques des cellules sensorielles de la rétine et de l'oreille interne

### a. Les photorécepteurs et les cellules bipolaires

Des mutations dans le gène CACNA1F codant le canal Cav1.4 ( $\alpha 1F$ ), à l'origine de cécités CSNB2, ont permis de mettre en évidence le rôle de ce canal dans la transmission synaptique des cellules sensorielles de la rétine (Strom *et al.*, 1998). Leurs propriétés biophysiques se rapprochent de celles des canaux Cav1.3, aussi présents dans les photorécepteurs (Xiao *et al.*, 2007), mais majoritairement exprimés par les cellules ciliées et caractérisés par une inactivation lente (Baumann *et al.*, 2004). Le canal calcique  $\alpha 1F$  est associé à la sous-unité régulatrice  $\beta 2$ , régulant l'expression du canal Cav1.4 et le développement de la couche plexiforme externe (Ball *et al.*, 2002), et à la sous-unité  $\alpha 2\delta 4$  (De Sevilla Müller, *et al.*, 2013). La visualisation des zones actives de la couche plexiforme externe où sont localisés les photorécepteurs montre une très bonne colocalisation entre les canaux Cav1.4 et les rubans pré-synaptiques (Liu *et al.*, 2013).

*b. Les cellules sensorielles auditives*

Les cellules ciliées auditives expriment majoritairement la sous-unité  $\alpha 1D$  (isoforme Cav1.3; Platzer *et al.*, 2000). Cette équipe a mis en évidence, dans un modèle murin n'exprimant plus la sous-unité  $\alpha 1D$  ( $\alpha 1D^{-/-}$ ), que cette dernière est importante dans la régulation du rythme sinusal cardiaque. Les souris n'exprimant plus la sous-unité  $\alpha 1D$  sont profondément sourdes car celle-ci est à l'origine de l'influx calcique synaptique dans les CCI. Les auteurs de cette étude ont aussi montré que le canal calcique Cav1.3 est important pour la survie des CCI et des CCEs.

Dès lors, de nombreuses études visant à caractériser le rôle de ces canaux calciques dans la physiologie des CCI et des CCEs ont été menées. Le courant calcique des CCI  $\alpha 1D^{-/-}$  présente une diminution d'environ 90 % de son amplitude à l'origine d'une abolition complète de l'exocytose (Brandt *et al.*, 2003). Il apparaît donc que 10 % du courant calcique des CCI sont portés par une ou plusieurs autres familles de canaux calciques n'ayant pas encore été identifiées. Dans les CCI immatures, les canaux calciques Cav1.3 sont localisés en majorité en dehors des zones actives (Zampini *et al.*, 2010). Au cours de la maturation du système auditif, les canaux Cav1.3 se concentrent sous les rubans pré-synaptiques des CCI (Brandt *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2014; Rutherford, 2015). Ainsi lorsque le système auditif est complètement mature (après P12 chez la souris), les canaux Cav1.3 sont très proches des sites de fusion et permettent une exocytose très efficace (Beutner and Moser, 2001; Johnson *et al.*, 2005). La distance entre les canaux calciques et les vésicules pré-synaptiques régulerait aussi la cinétique de relargage du RRP dans le calice de Held, un des relais synaptiques supérieurs des voies auditives centrales (Chen *et al.*, 2015).

**Question 6: Comment l'organisation synaptique des canaux Cav1.3 contrôle-t-elle l'efficacité de l'exocytose des CCI ?**

Comme indiqué précédemment, les sous-unités auxiliaires sont importantes pour réguler l'activité des canaux calciques. Les CCI matures expriment les sous-unités  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 3$  mais seule la sous-unité  $\beta 2$  est impliquée dans la régulation du nombre de canaux Cav1.3 à la membrane et par conséquent dans la maturation des zones actives au cours du développement chez la souris (Neef *et al.*, 2009). Les souris n'exprimant pas la sous-unité  $\beta 2$  présentent une surdité profonde.

Une autre équipe allemande a étudié le rôle des sous-unités  $\alpha 2\delta 2$  et  $\alpha 2\delta 3$  dans la physiologie des CCI. Il apparaît que la sous-unité  $\alpha 2\delta 2$  est exprimée par les CCI et les CCEs. Les souris mutées pour cette sous-unité ne présentent qu'une très faible diminution de leur seuil d'audition alors que leur courant calcique est diminué d'environ 30 % (Fell *et al.*, 2014). La seconde isoforme de la sous-unité  $\alpha 2\delta$  retrouvée dans l'organe de Corti et les relais centraux de la voie auditive est la sous-unité  $\alpha 2\delta 3$  (Pirone *et al.*, 2014). Celle-ci est seulement exprimée dans le ganglion spiral où cette sous-unité est associée à l'expression du canal calcique Cav2.1 ( $\alpha 1A$ ).

De plus, quelques études portant sur l'analyse des courants calciques des CCEs suggèrent fortement que l'isoforme Cav1.3 est l'isoforme majoritairement exprimée par les CCEs immatures (Michna *et al.*, 2003) et matures (Dou *et al.*, 2004; Knirsch *et al.*, 2007).

c. *Les cellules sensorielles vestibulaires*

Les études portant sur les cellules ciliées vestibulaires montrent qu'elles expriment plusieurs familles de canaux calciques. En effet, les souris  $\alpha 1D^{-/-}$  ne présentent pas de trouble de l'équilibre et seulement 50 % du courant calcique est bloqué, suggérant la présence d'autres canaux calciques (Dou *et al.*, 2004). Les 50 % du courant restant seraient portés par les canaux de types T (Nie *et al.*, 2008), N (Su *et al.*, 1995) et R (Martini *et al.*, 2000). L'organisation spatiale des canaux calciques au niveau des zones actives des cellules vestibulaires n'a pas encore été étudiée.

**Question 7: L'organisation spatiale des canaux calciques et l'efficacité d'exocytose des CCU-I sont-elles différentes de celle des CCI's ?**

Les cellules ciliées utriculaires de type I (CCU-I) sont contactées par une seule fibre afférente qui forme un calice intégrant l'activité d'une dizaine de rubans (Eatock and Songer, 2011). Les CCI's sont en contact avec 15-20 fibres afférentes, chacune intégrant l'activité d'un seul ruban (Meyer *et al.*, 2009). Les caractéristiques des signaux que ces deux types cellulaires encodent sont très différentes. Les CCU-I encodent des signaux de faibles fréquences (quelques dizaines de Hz) sur une courte dynamique alors que les CCI's encodent des signaux à hautes fréquences dans une large gamme d'intensité.

**Question 8: Pour répondre à leurs impératifs d'encodage synaptique spécifique, les exocytoses des CCI's et des CCU-I présentent-elles des sensibilités calciques différentes?**

d. *Les isoformes du canal calcique Cav1.3 dans les cellules ciliées sensorielles*

Dernièrement, l'équipe de Jörg Striessnig a démontré la présence de l'isoforme courte Cav1.3<sub>435</sub> dans les CCI's et les CCE's (Scharinger *et al.*, 2015). Pour la première fois, le rôle de la partie C-terminale du canal Cav1.3 a été étudié dans un contexte physiologique et non plus dans un système de ré-expression hétérologue *in vitro*, dans lequel la sous-unité  $\alpha 1D$  et les sous-unités régulatrices sont transfectées (Scharinger *et al.*, 2015). Le remplacement de certains acides aminés codant une partie du domaine DCRD par un « tag » hémagglutinine (Cav1.3-HA) dans la séquence codant pour la sous-unité  $\alpha 1D$ , a pour conséquence d'empêcher la formation du domaine régulateur CTM (**Fig. 25**). L'étude des courants calciques de ces souris Cav1.3-HA, montre une augmentation de l'amplitude de leur courant avec un ralentissement de la vitesse d'inactivation. Ce dernier résultat entre en contradiction avec l'accélération des cinétiques d'inactivation des isoformes courtes dans les systèmes d'expression hétérologue (Singh *et al.*, 2008; Bock *et al.*, 2011). Les auteurs proposent que les CaBPs, très fortement exprimées dans les CCI's sont capables de rentrer plus facilement en compétition avec la fixation de la calmoduline sur les domaines IQ et pré IQ lorsque le domaine régulateur CTM n'est pas présent.

En résumé, l'ARN messager du canal calcique Cav1.3 peut subir de nombreux épissages alternatifs permettant l'expression de canaux calciques Cav1.3 avec différentes propriétés biophysiques, *i.e.* sensibilité au voltage (potentiel de demi-activation,  $V_{1/2}$ ), cinétique d'activation et d'inactivation (Bock *et al.*, 2011) et leur sensibilité aux dihydropyridines.

**Question 9: Les cellules sensorielles expriment-elles différentes isoformes du canal Cav1.3 ? Si oui, comment influencent-elles l'exocytose de ces cellules ?**

# Objectifs



L'entrée des ions  $\text{Ca}^{2+}$  par les canaux calciques Cav1.3 constitue le processus clé à l'origine de l'exocytose dans les synapses à ruban des cellules ciliées. Mes travaux de recherche avaient pour objectif principal d'étudier comment ces canaux calciques s'organisent spatialement dans les zones actives de ces cellules. Par ailleurs, nous avons étudié le rôle du cytosquelette d'actine, de la clarine-1 et de l'otoferline, dans la mise en place et l'organisation de ces canaux. Nous nous sommes aussi intéressés à leur régulation par le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et par les variations du pH extracellulaire. Cette régulation de l'activité des canaux calciques pourrait être un des facteurs à l'origine de l'adaptation rapide de la vitesse de décharges des fibres nerveuses afférentes du nerf auditif. Cette adaptation rapide est essentielle aux impératifs temporels des synapses à ruban auditives ("phase-locking") et à la localisation rapide du son dans l'espace.

**Objectif 1: Déterminer et comparer l'organisation des canaux Cav1.3 et la sensibilité calcique de l'exocytose dans les cellules ciliées auditives (CCIs) et vestibulaires (CCU-I)**

Les fibres afférentes connectées à la CCI et à la cellule ciliée utriculaire de type I (CCU-I) diffèrent de par leur morphologie (bouton vs calice) mais aussi de par leurs propriétés de décharges spontanées et évoquées (fréquence et dynamique de réponse). Ces deux types de cellules ciliées présentent-elles une organisation spécifique des canaux Cav1.3 dans leurs zones actives et/ou expriment-elles un senseur calcique avec une affinité différente?

**Objectif 2: Identifier et déterminer le rôle possible des isoformes courtes du canal calcique Cav1.3**

Les canaux calciques Cav1.3 présentent différents sites d'épissages notamment dans leur région C-terminale. Ces isoformes ont des propriétés conductrices très différentes (sensibilité au voltage, cinétiques d'activation et d'inactivation). Par des techniques de RT-PCR et pharmacologique, nous avons exploré l'expression possible de certaines de ces isoformes dans les CCIs.

**Objectif 3: Déterminer le rôle du cytosquelette d'actine dans l'organisation des canaux Cav1.3**

Le cytosquelette d'actine est connu comme étant important dans l'organisation et le fonctionnement de nombreuses synapses, dont celles du système nerveux central. Dans les cellules ciliées, les micro-filaments d'actine (actine-F) sont des composants essentiels des stéréocils assurant la mécano-transduction. Un rôle possible de l'actine-F dans les synapses à ruban des cellules ciliées reste à ce jour inexploré. Le but de mon étude était d'étudier le rôle possible du cytosquelette d'actine dans l'organisation spatiale des canaux calciques et dans les ZAs des CCIs.

**Objectif 4: Caractériser la régulation pH des canaux Cav1.3**

Il existe une régulation des canaux calciques par le pH extracellulaire ( $\text{H}^+$  sécrétés lors de l'exocytose) au niveau de certaines synapses du système nerveux central et des synapses à rubans des photorécepteurs. Notre but était ici d'explorer si une telle régulation existait aussi au niveau des CCIs.

**Objectif 5: Déterminer le rôle de la clarine 1 dans l'organisation des canaux Cav1.3**

La clarine 1, une protéine mutée dans le syndrome d'Usher III, est impliquée dans l'organisation de l'actine-F, notamment au niveau des stéréocils des cellules ciliées. Son rôle dans les synapses à rubans de ces cellules reste mal défini. Notre but était ici de caractériser les modifications structurelles et fonctionnelles des synapses à ruban auditives chez les souris portant une délétion spécifique du gène de la clarine 1 dans les cellules ciliées.

# Résultats



# **Article 1**

## **Exocytotic Machineries of Vestibular Type I and Cochlear Ribbon Synapses Display Similar Intrinsic Otoferlin-Dependent Ca<sup>2+</sup> Sensitivity But a Different Coupling to Ca<sup>2+</sup> Channels**

**Philippe FY Vincent**, Yohan Bouleau, Saaid Safieddine, Christine Petit and Didier Dulon  
*The Journal of Neuroscience (2014) 34:10853-10869*

## **Introduction**

Les synapses à ruban des cellules ciliées auditives et vestibulaires des mammifères diffèrent grandement de par leur organisation anatomique et leurs propriétés de décharges. Particulièrement, les cellules vestibulaires de type I (CCU-I) sont enveloppées par une seule terminaison afférente en calice recevant des signaux de plusieurs rubans, alors que les CCI de la cochlée font synapses avec plusieurs boutons synaptiques afférents, chacun faisant face à un seul ruban. Les synapses des cellules vestibulaires codent pour les mouvements de la tête dans une gamme de faible fréquence en modulant leur vitesse de décharges dans une faible dynamique au dessus et en dessous de 30 à 100 décharges par seconde. Les synapses des cellules ciliées auditives encodent des signaux acoustiques complexes à travers une large gamme de fréquences (20 Hz à 20 kHz chez l'Homme) et à travers une large gamme d'intensités (0 à 120 dB SPL) en modulant la vitesse des décharges post-synaptiques de quelques dizaines de décharges par seconde jusqu'à plus de mille par seconde. Nous avons étudié les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'exocytose dans ces deux types de cellules ciliées.

## **Résultats**

- L'exocytose des CCU-I présente une meilleure efficacité calcique comparée à celle des CCI.
- L'exocytose des CCU-I présente une plus faible dynamique que celle des CCI.
- Chaque zone active des CCI possède environ 110 canaux calciques alors que celle des CCU-I en possède 160.
- Les canaux calciques, sous chaque ruban, se regroupent de manière à former une plaque circulaire de petite taille chez les CCU-I alors que ceux des CCI s'organise sous la forme d'une plaque ovoïde allongée.
- La distance moyenne entre les canaux calciques et les vésicules pré-synaptiques est plus courte chez les CCU-I (environ 45 nm) comparée à celle des CCI (environ 70 nm).
- La constante d'affinité du senseur calcique, l'otoferline, démontre une valeur identique dans les deux types de cellules ciliées (environ 4  $\mu$ M).

## **Conclusion**

L'ensemble de nos résultats suggère que les cellules ciliées auditives et vestibulaires organisent leurs zones actives, et en particulier la distribution des canaux calciques pré-synaptiques à la membrane, de manière très spécifique. Cette organisation permet aux cellules de moduler l'efficacité de la fusion vésiculaire en fonction de l'influx calcique. Cette différence d'efficacité et de dynamique d'exocytose permettrait d'expliquer la spécificité d'encodage neuronal au niveau des synapses à ruban auditives et vestibulaires.

# Exocytotic Machineries of Vestibular Type I and Cochlear Ribbon Synapses Display Similar Intrinsic Otoferlin-Dependent $\text{Ca}^{2+}$ Sensitivity But a Different Coupling to $\text{Ca}^{2+}$ Channels

Philippe F.Y. Vincent,<sup>1</sup> Yohan Bouleau,<sup>1</sup> Saaid Safieddine,<sup>2</sup> Christine Petit,<sup>2,3</sup> and Didier Dulon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Bordeaux, Institut des Neurosciences de Bordeaux, Equipe Neurophysiologie de la Synapse Auditive, Inserm, Unité Mixte de Recherche 1120, Centre Hospitalier Universitaire hôpital Pellegrin, 33076 Bordeaux, France, <sup>2</sup>Institut Pasteur et Université Pierre et Marie Curie, Unité de Génétique et Physiologie de l'Audition, Inserm Unité Mixte de Recherche 1120, 75015 Paris, France, and <sup>3</sup>Collège de France, 75005 Paris, France

The hair cell ribbon synapses of the mammalian auditory and vestibular systems differ greatly in their anatomical organization and firing properties. Notably, vestibular Type I hair cells (VHC-I) are surrounded by a single calyx-type afferent terminal that receives input from several ribbons, whereas cochlear inner hair cells (IHCs) are contacted by several individual afferent boutons, each facing a single ribbon. The specificity of the presynaptic molecular mechanisms regulating transmitter release at these different sensory ribbon synapses is not well understood. Here, we found that exocytosis during voltage activation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels displayed higher  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity, 10 mV more negative half-maximum activation, and a smaller dynamic range in VHC-I than in IHCs. VHC-I had a larger number of  $\text{Ca}^{2+}$  channels per ribbon (158 vs 110 in IHCs), but their  $\text{Ca}^{2+}$  current density was twofold smaller because of a smaller open probability and unitary conductance. Using confocal and stimulated emission depletion immunofluorescence microscopy, we showed that VHC-I had fewer synaptic ribbons (7 vs 17 in IHCs) to which Cav1.3 channels are more tightly organized than in IHCs. Gradual intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging experiments revealed that exocytosis had a similar intrinsic  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity in both VHC-I and IHCs ( $K_D$  of  $3.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$  and  $4.0 \pm 0.7 \mu\text{M}$ , respectively). In otoferlin-deficient mice, exocytosis was largely reduced in VHC-I and IHCs. We conclude that VHC-I and IHCs use a similar micromolar-sensitive otoferlin  $\text{Ca}^{2+}$  sensor and that their sensory encoding specificity is essentially determined by a different functional organization of  $\text{Ca}^{2+}$  channels at their synaptic ribbons.

**Key words:** auditory; exocytosis; hair cell; otoferlin; synapse; vestibular

## Introduction

Synaptic transmission at mammalian auditory and vestibular hair cell ribbon synapses shares several fundamental properties. In the auditory system, transmitter release occurs with high temporal precision and reliability to ensure phase-locking and spatial sound-localization (Kiang, 1965; Palmer and Russell, 1986). Similar high temporal precision and speed are required at vestibular hair cell synapses to trigger the ms-range vestibulo-ocular reflex (Huterer and Cullen, 2002). Furthermore, both types of hair cells must involve an indefatigable supply of synaptic vesicles to the

ribbon to sustain high rates of transmitter release during endless ongoing stimulation (Fuchs, 2005; Eatock and Songer, 2011). Another common property is multivesicular release that produces large EPSCs to instantaneously drive afferents fibers to spike threshold (Glowatzki and Fuchs, 2002; Grant et al., 2010). Evidence for multivesicular release has also been reported in vestibular hair cells (Rennie and Streeter, 2006; Dulon et al., 2009).

Otoferlin, a C2 domain protein, is an essential  $\text{Ca}^{2+}$  sensor that controls transmitter release at the ribbon synapses of cochlear (Roux et al., 2006; Beurg et al., 2010; Pangrsic et al., 2010) and vestibular hair cells (Dulon et al., 2009). It has been suggested that otoferlin functions as a high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  sensor that linearizes exocytosis during voltage activation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in vestibular hair cells (Dulon et al., 2009). However, the intrinsic  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of otoferlin in vestibular and cochlear hair cell synapses remains to be determined. In the present study, we used gradual uncaging  $\text{Ca}^{2+}$  experiments combined with whole-cell patch-clamp capacitance measurements to investigate the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of exocytosis in vestibular Type I hair cells (VHC-I) and cochlear inner hair cells (IHCs). Both types of hair cells differ greatly in the morphological organization of their afferent synapses. Notably, VHC-I are enveloped by a single large calyceal

Received March 10, 2014; revised June 22, 2014; accepted June 23, 2014.

Author contributions: P.F.Y.V. and D.D. designed research; P.F.Y.V., Y.B., and D.D. performed research; P.F.Y.V., Y.B., S.S., C.P., and D.D. analyzed data; P.F.Y.V. and D.D. wrote the paper.

We thank Ombeline de La Rochefoucauld for assistance in analyzing the  $\text{Ca}^{2+}$  chelator experiments under MATLAB software and Jean-Pierre Hardelin for critical reading of the manuscript.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to either Dr. Didier Dulon or Philippe Vincent, Université de Bordeaux, Institut des Neurosciences de Bordeaux, Equipe Neurophysiologie de la Synapse Auditive, Inserm, Unité Mixte de Recherche 1120, hôpital Pellegrin, 33076 Bordeaux, France, E-mail: didier.dulon@inserm.fr or philippe.vincent@inserm.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0947-14.2014

Copyright © 2014 the authors 0270-6474/14/3410853-17\$15.00/0

afferent ending that encodes the activity of several presynaptic ribbons (Eatock and Songer, 2011; Lysakowski et al., 2011; Songer and Eatock, 2013). On other hand, IHCs are contacted by 10–20 individual small afferent bouton endings (Lieberman et al., 1990, 2011; Meyer et al., 2009), each bouton sensing the  $Ca^{2+}$ -dependent activity of a single ribbon (Goutman and Glowatzki, 2007). Cav1.3 channels are the main L-type  $Ca^{2+}$  channel subunits involved in synaptic exocytosis in both IHCs (Platzer et al., 2000; Brandt et al., 2003) and VHC-I (Dou et al., 2004). In IHCs, the membrane-associated Cav1.3 channels aggregate in small clusters in close spatial organization to the synaptic ribbons (Brandt et al., 2005), forming a spatially restricted  $Ca^{2+}$  microdomain at the active zone (Frank et al., 2009; Wong et al., 2014). However, neither the number of  $Ca^{2+}$  channels nor their spatial distribution at VHC-I calyx ribbon synapses has yet been explored. Here, we used various depolarizing protocols to investigate the functional organization of  $Ca^{2+}$  channels and the  $Ca^{2+}$  sensitivity of exocytosis in mouse VHC-I and IHCs. Furthermore, immunofluorescent confocal and stimulated emission depletion (STED) imaging were used to characterize the spatial organization of Cav1.3 channels in both types of hair cells.

## Materials and Methods

### Tissue preparation

Experiments were performed in accordance with the guidelines of the Animal Care Committee of the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and the ethics committee of the University of Bordeaux. All mice (C57BL6 of either sex) were anesthetized by intraperitoneal injection of xylazine (6 mg/ml) and ketamine (80 mg/ml) mixture (Sigma-Aldrich) diluted in physiological saline. For calcium uncaging experiments, vestibular and cochlear organs were dissected from littermate controls (*Otof*<sup>+/+</sup>, *Otof*<sup>+/-</sup>) or from knock-out otoferlin (*Otof*<sup>-/-</sup>) C57BL/6 mice as previously described (Dulon et al., 2009; Beurg et al., 2010).

Electrophysiological recordings from IHCs were obtained in whole-mount organ of Corti (OC) at postnatal day 12–14 (P12–P14), an age near the onset of hearing in mice (Ehret, 1983). In OC, all recordings were performed in the 20%–40% normalized distance from the apex, an area coding for frequencies ranging from 8 to 16 kHz (Meyer et al., 2009).

Electrophysiological experiments in VHC-I were performed in intact whole-mount utricles at postnatal day 5–7 (P5–P7), an age close to the onset of vestibular evoked potentials in mice (Jones and Jones, 2007; Lai et al., 2008). In the utricle, VHC-I were identified under contrast microscopy by their surrounding large calyceal afferent fiber as previously described (Dulon et al., 2009). All recordings were performed in the striola region of the utricles in which faster maturation of Type I hair cells occurs (Rüsch et al., 1998).

The OC or utricle was freshly dissected under binocular microscopy in an extracellular solution maintained at 4°C containing the following (in mM): 135 NaCl, 5.8 KCl, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 0.9 MgCl<sub>2</sub>, 0.7 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6 glucose, 2 Na pyruvate, 10 HEPES, pH 7.4, 305 mOsm. Tectorial membrane (OC) and otoconia (utricle) were carefully removed. The OC or the utricle was placed in a recording chamber and hair cells observed with a 60× water-immersion objective (CFI Fluor 60× W NIR, WD = 2.0 mm, NA = 1) attached to an upright Nikon FN1 microscope. The extracellular solution was complemented with 0.5 μM of apamin (Latoxan) and 0.2 μM of XE-991 (Tocris Bioscience) to block SK channels and KCNQ4 channels, respectively. The external  $Ca^{2+}$  concentration was increased from 1.3 to 5 mM to enhance the amplitude of  $Ca^{2+}$  currents. All experiments were performed at room temperature (22°C–24°C).

### Whole-cell recording and capacitance measurement

All patch-clamp experiments were performed with an EPC10 amplifier controlled by pulse software Patchmaster (HEKA Elektronik). Patch pipettes were pulled with a micropipette Puller P-97 Flaming/Brown (Sutter Instrument) and fire polished with a Micro forge MF-830 (Narishige) to obtain a resistance range from 3 to 5 MΩ. Patch pipettes were filled

with intracellular solution containing the following (in mM): 145 CsCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 1 EGTA, 20 TEA, pH 7.2, 300 mOsm. Our recording solution was ATP and GTP free to prevent the activation of P2Y-P2X receptors when approaching the patch-pipette with positive pressure near the cells, but also to reduce intracellular  $Ca^{2+}$  buffering by nucleotides. The absence of ATP and GTP in the intracellular patch pipette did not change  $Ca^{2+}$  currents and exocytosis when limiting: (1) the whole-cell recording time to 5–7 min after break-in; and (2) the voltage stimuli to a short period <100 ms. Exocytotic responses shown in the present studies are comparable with our previous studies where 5 mM ATP and 0.5 mM GTP were present in the recording solutions (Dulon et al., 2009; Beurg et al., 2010). Because the sensory organs are continuously bathing in an extracellular medium with Na-pyruvate and glucose, we think that hair cells produce and contain enough intrinsic intracellular ATP to sustain brief RRP exocytotic responses.

**Ramp stimulation.** Cells were maintained at -80 mV and depolarized from -90 mV to 30 mV in 120 ms giving a slope of voltage change of 1 mV/ms.

**Counting of  $Ca^{2+}$  channels.** The number of  $Ca^{2+}$  channels in VHC-I and IHCs was determined by using the nonstationary fluctuation analysis of tail current previously described by Roberts et al. (1990). Tail currents were recorded at -62 mV after a 15 ms depolarization step from -100 mV (holding potential) to 30 mV (maximum of open channels). This protocol was repeated 500 times at intervals of 80 ms. Measurement of variance was performed after rescale of each of the 500 peaks of tail current to the maximum peak observed. Variance was calculated with the following formula (Roberts et al., 1990; Brandt et al., 2005):

$$\sigma^2(t) = 1/(2K - 1) \sum_{i=1}^{K-1} [X_i(t) - X_{i+1}(t)]^2$$

where  $K$  is the number of stimuli used (500) and  $x_i(t)$  is the leak subtracted response to the  $i$ th stimulus. After plotting the variance versus the mean of tail currents ( $I_{\text{mean}}$ ), data points were fitted using the following formula:

$$\text{var} = iI_{\text{mean}} - (I_{\text{mean}}^2/N)$$

where  $i$  is the unitary current and  $N$  the number of  $Ca^{2+}$  channels. Tail-current recordings were performed in extracellular solution with 10 mM  $Ca^{2+}$  and 1 mM  $Ba^{2+}$  and 5 μM BayK8644, a dihydropyridine agonist increasing the open probability of  $Ca^{2+}$  channels (Brown et al., 1984; Brandt et al., 2005).

**Real-time capacitance measurement.** Membrane capacitance measurements ( $C_m$ ) were performed using the Lock-in amplifier Patchmaster software (HEKA) by applying a 1 kHz command sine wave (amplitude 20 mV) at holding potential (-80 mV) before and after the pulse experiment. Because capacitance measurement requires high and constant membrane resistance ( $R_m$ ) (Johnson et al., 2005), the amplitude of the sine wave was small enough to avoid activation of significant membrane current. Exocytosis ( $\Delta C_m$ ) was calculated by subtracting the average capacitance measurement 60–100 ms after the depolarizing pulse (end of tail current) and the average capacitance measurement 50 ms before the pulse as baseline.

**Voltage stimulation.** Two protocols were used. First, a protocol probing the kinetics of exocytosis where the cells were depolarized from -80 mV to -10 mV for increasing time duration from 10 to 120 ms in 10 ms increments. Second, a protocol probing the voltage dependence of exocytosis where the cells were depolarized from -90 mV to 5 mV in 5 mV increments for a constant 25 ms duration. Only cells with stable  $R_m$ , leak current <50 pA at holding potential (-80 mV) and stable series resistance <20 MΩ were considered in the study. All  $Ca^{2+}$  currents were leak subtracted by using a linear function calculated from the leak current at holding potential (-80 mV) and the approximated reversal potential of the leak current (Brandt et al., 2005).

**Calcium charge ( $Q_{Ca}$ ) measurement.** The  $Ca^{2+}$  charge was calculated with Patchmaster software by integrating the area from the start of the  $Ca^{2+}$  current to the end of the  $Ca^{2+}$  tail current.

### Ca<sup>2+</sup> chelator experiments

We evaluated the coupling distance between Ca<sup>2+</sup> channels and Ca<sup>2+</sup> sensors by testing the concentration dependence of two Ca<sup>2+</sup> chelators (EGTA and BAPTA) on the Ca<sup>2+</sup> efficiency of exocytosis ( $\Delta_{Cm}/Q_{Ca}$ ). Data points were fitted using the linearized reaction diffusion equation assuming that the saturation of exogenous buffer was negligible (Neher, 1998; Bucurenciu et al., 2008) as follows:

$$\Delta_{Cm}/Q_{Ca} = \exp(-r/\lambda_b)/\exp(-r/\lambda_0)$$

$$\lambda_0 = \sqrt{D_{Ca}/(K_{on}^o [B]^o)}$$

$$\lambda_b = \sqrt{D_{Ca}/(K_{on}^o [B]^o + K_{on}^b B_T^b K_D^b / ([Ca^{2+}]_r^n + K_D^b)}$$

where  $r$  is the distance between the Ca<sup>2+</sup> channels and the sensor,  $D_{Ca}$  is the diffusion coefficient of free Ca<sup>2+</sup>,  $K_{on}^o [B]^o$  is the buffer product of endogenous buffer,  $K_{on}^b$  is the rate constant of Ca<sup>2+</sup> binding to exogenous buffer,  $B_T^b$  is the total concentration of exogenous Ca<sup>2+</sup> buffer,  $K_D^b$  is dissociation constant of exogenous buffer,  $[Ca^{2+}]_r^n$  is the resting Ca<sup>2+</sup> concentration and  $n$  the Hill cooperativity coefficient of otoferlin. We assumed that physicochemical properties follow those previously described (Bucurenciu et al., 2008; Vyleta and Jonas, 2014):  $D_{Ca} = 220 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $K_{on}^o = 4 \times 10^8 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  for BAPTA and  $1 \times 10^7 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  for EGTA,  $K_D^b = 0.22 \mu\text{M}$  for BAPTA and  $0.07 \mu\text{M}$  for EGTA.  $[Ca^{2+}]_r^n$  has been determined by using AM loaded dye in frog saccular hair cells (Hall et al., 1997) and is assumed to be  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  in IHCs and VHC-I. The coefficient of cooperativity ( $n$ ) was set at 3 (see our Fig. 9).  $K_{on}^o [B]^o$  was determined as  $[B]_{\text{endo}} \times E_{\text{on}} = 9 \times 10^7 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \times 0.001 \text{M} = 9000 \text{s}^{-1}$  in VHC and  $9 \times 10^7 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \times 0.003 \text{M} = 2700 \text{s}^{-1}$  in IHCs.  $[B]_{\text{endo}}$  is the concentration of endogenous buffer (1 mM in VHC; Hall et al., 1997; 0.3 mM in IHCs; Hackney et al., 2005).  $E_{\text{on}}$  is the on rate constant of Ca<sup>2+</sup> binding to endogenous buffer ( $9 \times 10^7 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ; Hall et al., 1997). We assumed that  $E_{\text{on}}$  is equal in both VHC-I and IHCs.

### Caged Ca<sup>2+</sup> photolysis and Ca<sup>2+</sup> concentration measurement

To trigger a progressive step-increase in the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration from the caged Ca<sup>2+</sup> chelator DM-nitrophen (Interchim), we used brief flashes from a UV LED light source (Mic-LED 365, 128 mW, Prizmatix). The UV LED was directly connected to the epi-illumination port at the rear of the upright Nikon FN1 microscope and illumination focused through the 60 $\times$  objective (CFI Fluor 60 $\times$  W NIR, WD = 2.0 mm, NA = 1). Changes in  $[Ca^{2+}]_i$  were continuously measured with a C2 confocal system and NIS-elements imaging software (Nikon) coupled to the FN1 microscope. The low-affinity Ca<sup>2+</sup> dye Oregon Green Bapta-5N (OGB-5N,  $K_D = 20 \mu\text{M}$ , Invitrogen) was used as intracellular calcium probe. The dye was excited with a 488 nm solid-state laser (85-BCD-010-706, Melles Griot) and emission recorded at 500–530 nm. We used OGB-5N because there is no photolysis of DM-nitrophen with visible-light excitation at 488 nm. This allowed continuous monitoring of Ca<sup>2+</sup> signals during the multi UV flash protocol.

For simultaneous Ca<sup>2+</sup> uncaging and OGB-5N- $[Ca^{2+}]_i$  experiments, in which membrane capacitance was continuously recorded, patch pipettes were filled with the following solution (in mM): 145 CsCl, 5 HEPES, 20 TEA, 10 DM-nitrophen, 10 CaCl<sub>2</sub>, 0.05 OGB-5N. After rupture of the patch, we waited systematically for 2 min at holding potential of  $-70 \text{mV}$  to load and equilibrate the cells. Thirteen TTL-triggered 10 ms UV flashes 200 ms apart were then applied to the cells. These brief successive flashes allowed a progressive step-increase in  $[Ca^{2+}]_i$  from up to  $20 \mu\text{M}$ . The 200 ms interval between each TTL-UV flash was meant to allow nearly complete vesicular replenishment to the ribbon, as estimated by Levic et al. (2011). OGB-5N-emission fluorescence was analyzed by the ratio  $F/F_{\text{max}}$  ratio, where  $F_{\text{max}}$  is the maximum fluorescence found with *in vivo* calibration in each cell type. The instantaneous rate of release was measured by fitting the first 20 ms of the response after each flash, thereby giving the rate of the ready release component (RRP) at each concentration of Ca<sup>2+</sup>.

In some experiments, endocytosis was measured in hair cells loaded with the following (in mM): 145 CsCl, 5 HEPES, 20 TEA, 10 DM-nitrophen, 10 CaCl<sub>2</sub>, and flashed with a high energy UV illumination system connected to the rear of the FN1 microscope (Nikon Intensilight

C-HGFI, HG lamp 130 W, excitation 330–380 nm). In these conditions, using the low-affinity Ca<sup>2+</sup> dye Fluo-5N ( $K_D = 90 \mu\text{M}$ ; Invitrogen),  $[Ca^{2+}]_i$  was measured to jump directly to  $80 \mu\text{M}$ .

*In vivo calibration of OGB-5N.* We performed an *in vivo* calibration of the Ca<sup>2+</sup>-dependent fluorescent signal of OGB-5N. Hair cells were voltage-clamped at  $-70 \text{mV}$  in whole-cell configuration with different solutions containing various free calcium concentrations ( $[Ca^{2+}]_{\text{free}}$ ) from 1 to  $100 \mu\text{M}$ . The patch pipettes were filled with a Cs-based solution (in mM: 145 CsCl, 5 HEPES, 20 TEA, 0.05 OGB-5N) and different concentration of Ca<sup>2+</sup> and EGTA. The freeware Ca-EGTA Maxchelator was used to determine  $[Ca^{2+}]_{\text{free}}$ . After 2 min of cell loading and equilibrium, the fluorescence signal was measured at each  $[Ca^{2+}]_{\text{free}}$  in different VHC-I and IHCs (Fig. 7A,B). Fluorescence emission values were plotted as  $F/F_{\text{max}}$  against  $[Ca^{2+}]_{\text{free}}$ . Data points were best fitted by using a sigmoidal function with a  $K_D$  of  $13.81 \pm 1.81 \mu\text{M}$  and  $23.30 \pm 0.71 \mu\text{M}$  in VHC-I and IHCs, respectively. These  $K_D$  values are very close to the value reported *in vitro* ( $K_D = 20 \mu\text{M}$ , Molecular Probes, Invitrogen). Intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  obtained after each UV flash was calculated by using the following formula:

$$[Ca^{2+}]_i = K_D (F - F_{\text{min}})/(F_{\text{max}} - F)$$

where  $K_D$  is the respective *in vivo* constant of dissociation measured in VHC-I and IHCs (Fig. 7A,B),  $F$  is the fluorescence at time  $t$ ,  $F_{\text{min}}$  is the minimum fluorescence, and  $F_{\text{max}}$  is the maximal fluorescence.

### Immunohistofluorescence

*Preparation of tissues.* The ramps of the cochlear and vestibular apparatus of P12–P14 mice were rapidly perfused with 100% methanol at  $-20^\circ\text{C}$  for 30 min and washed with cold PBS. The inner ear was then incubated for 2 h in PBS solution containing 10% EDTA. The OC and utricle were then dissected and the tectorial membrane and otoconia removed. Tissues were first incubated with PBS containing 30% normal horse serum for 1 h at room temperature. Then, they were incubated with primary antibodies diluted with PBS (1:200) containing 5% horse serum and 0.1% Triton X-100. Synaptic ribbons, Cav1.3 channels, and otoferlin were simultaneously labeled with anti-CtBP2 (goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology; catalog #SC-5966), anti-Cav1.3 (rabbit polyclonal, Alomone Labs; catalog #ACC-005) and anti-otoferlin (mouse monoclonal, AbCam, Paris, France; catalog #ab53233) antibodies, respectively. Actin-F was also used to visualize hair cells (1:100, Phalloidin Fluorprobe 405, Interchim; catalog #FP-CA9870). In some experiments, anti-otoferlin antibodies were replaced by anti-NF200 antibodies to identify the afferent calyceal processes around VHC-I. The OC and utricle were then washed with PBS and incubated in two steps with secondary antibodies at 1:500: first donkey anti-goat Fluorprobe 547H (Interchim; catalog #FP-SB2110) and donkey anti-mouse Fluorprobe 647 (Interchim; catalog #FP-SC4110), second after PBS rinse with goat anti-rabbit AlexaFluor-488 (Invitrogen; catalog #A-11008). Surface preparations of OC (apical turns) and utricles were then mounted on Superfrost-Plus glass slides (Kindler) in a Prolong-Antifade medium (Invitrogen) and kept in the dark at  $-20^\circ\text{C}$  until observation. All immunoreactions in utricles and OC were performed simultaneously on the same days in rigorously identical conditions.

*Image acquisition.* Fluorescence images of utricles and OC were also acquired in parallel with identical confocal imaging parameters during the same imaging sessions. The experiments were repeated 5 times in different mouse dissections and immunoreactions.

Samples were analyzed using a confocal laser scanning microscope Leica SP8 with a 63 $\times$  oil-immersion objective (NA = 1.4) and white light laser (470–670 nm) (Bordeaux Imaging Center). Wavelengths were selected by an acousto-optical tunable filter (AOTF) associated with a photonic crystal fiber. This combination allowed precise selection of multiple wavelengths simultaneously. Phalloidin was imaged by using a diode laser at 405 nm also mounted on the microscope.

Stack images were acquired with the following parameters: laser power 40%, scan rate 700 Hz, scans averaged per X-Y section 4 times, step size 250 nm, pixel size 80 nm giving an X-Y image size of  $41 \times 41 \mu\text{m}$  ( $512 \times 512$  pixels). Images were then processed for 3D blind deconvolution with AutoQuant X2 (MediaCybernetics). After deconvolution, images were



processed under ImageJ software (W.S. Rasband, National Institutes of Health) and 3D-reconstructed for volume and surface area measurements with Imaris software (Bitplane AG).

**Image calibration.** We used fluorescent microbeads as references to calibrate confocal analysis of the Cav1.3 and CtBP2 signals. Fluoresbrite yellow-green carboxy-microspheres (mean diameter of  $0.490 \pm 0.004 \mu\text{m}$ ; Polysciences) with excitation and emission spectra close to Alexa-488 were used to calibrate Cav1.3 labeling. Fluoresbrite YO carboxy-microspheres ( $0.487 \pm 0.011 \mu\text{m}$ ; Polysciences), with excitation and emission spectra close to Fluoprobe 547H, were used to calibrate CtBP2 labeling. A diluted mixture of YG and YO beads was mounted between slide and coverslip in a mounting medium similar to that used for tissue samples. Confocal imaging of beads was done the same day and with the same confocal parameters as with tissue samples. Bead stack images were 3D-deconvoluted and 3D-reconstructed under the same conditions as for tissue samples. 3D-reconstructed images appeared as ellipsoid objects rather than as the expected spherical beads, suggesting image distortion. We therefore estimated the correcting factors for oblate ( $X$ - $Y$ ) and prolate ( $Z$ ) radius. We found that the  $X$ - $Y$  measured diameters (80 nm resolution) differed from real values by a factor of 1.21 and 1.00 in YG ( $n = 43$ ) and YO beads ( $n = 180$ ), respectively. In  $Z$ -directions and at a lower resolution of 250 nm, YG and YO diameters differed by a factor 2.11 and 3.01, respectively. All Cav1.3 and CtBP2 images were then corrected using these respective factors. Ribbon volumes were assessed by using the following formula:  $V = 4/3 \pi r_{\text{oblate}}^2 r_{\text{prolate}}$  and Cav1.3 surface areas with  $S = \pi r_{\text{oblate}}^2$ .

**Colocalization of Cav1.3 channels and ribbons.** Colocalization (center mass distance) was analyzed by the distance objects based methods with the JACoP plugin (Bolte and Cordelières, 2006; Di Biase et al., 2008) in ImageJ (W.S. Rasband, National Institutes of Health).

**STED microscopy.** For high-resolution imaging of Cav1.3 channels clusters at VHC-I and IHC ribbons, we used a Leica DMI6000 TCS SP5 STED microscope with 100X objective (NA 1.4) (Bordeaux Imaging Center). Mouse P21 sensory organs were fixed and incubated with primary anti Cav1.3 (1/100) and CtBP2 (1/100) antibodies in conditions similar to those described above for confocal microscopy. Secondary antibodies goat anti-rabbit Atto 647N (Sigma-Aldrich, catalog #40839; 1/200) and chicken anti-goat Alexa-594 (Invitrogen, catalog #A-21468; 1/200) were used to label anti-Cav1.3 and-CtBP2 primary antibodies, respectively. Two-color STED microscopy used two lasers with excitation wavelengths of 532 and 635 nm. The pulsed STED depletion laser (pulsed laser IR, Spectra Physics Mai Tai) was set at 750 nm. Stack images were acquired with the following parameters: scan rate 100 Hz, scans averaged per  $X$ - $Y$  section 8 times, pixel size 20 nm giving an  $X$ - $Y$  image size of  $21 \times 21 \mu\text{m}$  ( $1024 \times 1024$  pixels). Image analysis was performed with ImageJ software.

### Statistical analysis

Electrophysiological results were analyzed with Patchmaster (HEKA Elektronik), OriginPRO 9.1 (OriginLab), and IgorPro 6.3 (Wavemetrics). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed by using Student's  $t$  test. The limit of significance was set at 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## Results

### Density and voltage dependence of $\text{Ca}^{2+}$ currents

The voltage-ramp protocol revealed much larger global  $\text{Ca}^{2+}$  currents ( $I_{\text{Ca}}$ ) in IHCs than in VHC-I (Fig. 1A). Maximum  $I_{\text{Ca}}$  had a mean value of  $-53.33 \pm 6.69 \text{ pA}$  ( $n = 7$ ) and  $190.13 \pm 18.70 \text{ pA}$  ( $n = 10$ ) in VHC-I and IHCs, respectively ( $p < 0.001$ ). Because run-up of the  $\text{Ca}^{2+}$  current can be observed after break-in during whole-cell recording in hair cells (Schnee and Ricci, 2003),  $I_{\text{Ca}}$  amplitudes were systematically measured after stabilization of the run-up period (i.e., 2–3 min after rupturing the patch membrane in our experimental conditions). The amplitudes of the  $\text{Ca}^{2+}$  currents are in good agreement with previous studies in mouse VHC-I (Bao et al., 2003; Dulon et al., 2009) and IHCs (Brandt et al., 2005; Johnson et al., 2005; Beurq et al., 2010).

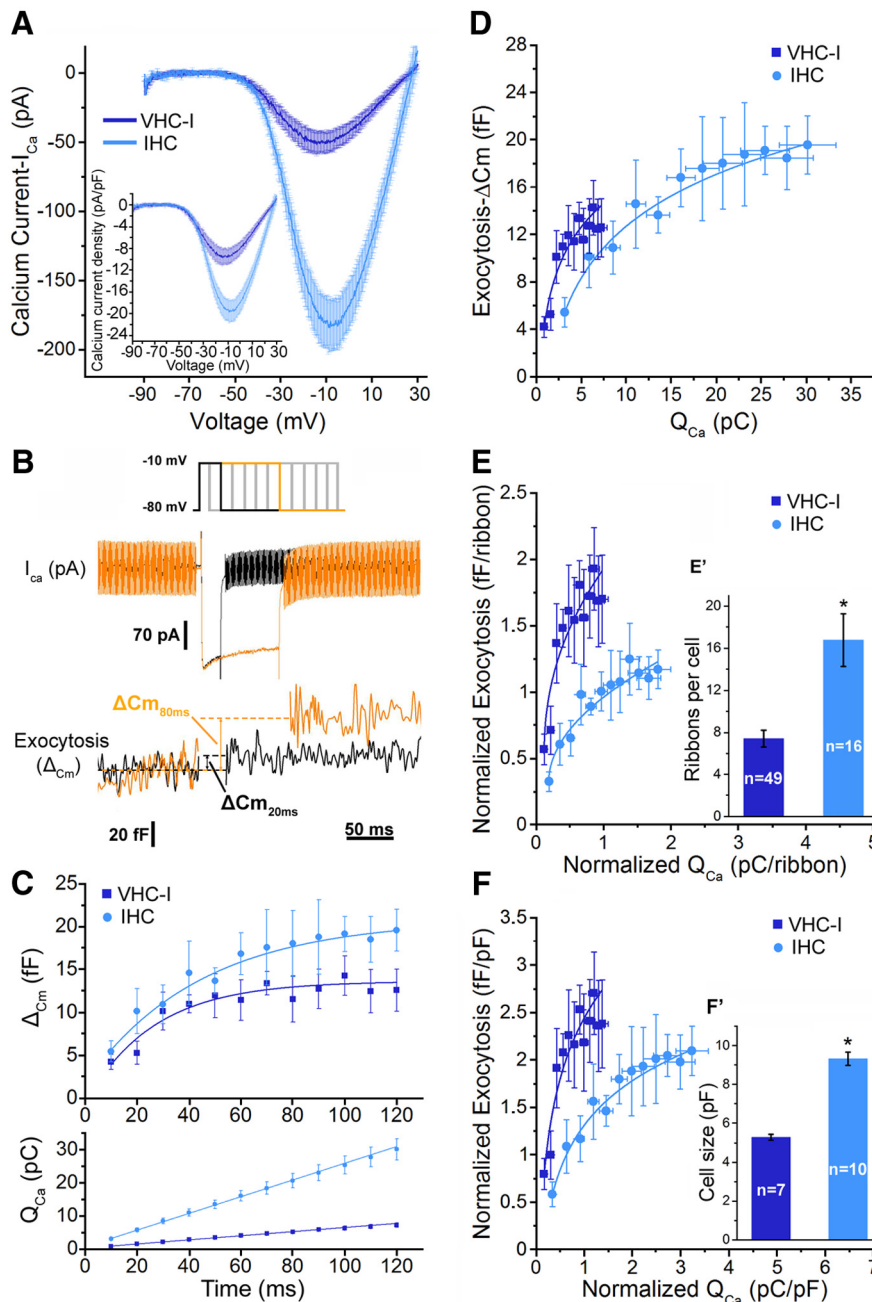
Notably, we found that the cell membrane surface area of VHC-I was twofold smaller than IHCs as indicated by their respective membrane capacitance of  $5.28 \pm 0.15 \text{ pF}$  and  $9.32 \pm 0.34 \text{ pF}$ , respectively (Fig. 1F'). Therefore, membranous  $I_{\text{Ca}}$  density ( $\text{pA/pF}$ ) was calculated to be twofold larger in IHCs than in VHC-I (VHC-I =  $-10.10 \pm 1.26 \text{ pA/pF}$ ; IHCs =  $-20.39 \pm 2.03 \text{ pA/pF}$ ;  $p < 0.001$ , Fig. 1A inset). Fitting the IV-ramp curve with a sigmoidal Boltzmann function ( $I_{\text{Ca}} = I_{\text{max}} / (1 + \exp[(V_{1/2} - V)/k])$ ), between  $-70 \text{ mV}$  and  $-10 \text{ mV}$ , indicated a more negative half-maximal voltage activation potential ( $V_{1/2}$ ) in VHC-I ( $-33.11 \pm 1.65 \text{ mV}$ ) than in IHCs ( $-27.07 \pm 0.73 \text{ mV}$ ,  $p < 0.05$ ). The slope of the Boltzmann function showed a similar relationship between channel activation and voltage with  $k = 6.18 \pm 0.22 \text{ pA/mV}$  and  $k = 5.56 \pm 0.28 \text{ pA/mV}$  in VHC-I and IHCs, respectively ( $p = 0.22$ ).

The total number of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in VHC-I and IHCs was then assessed by nonstationary fluctuation analysis of tail currents as previously described (Roberts et al., 1990; Brandt et al., 2005). Cells were depolarized to 30 mV and tail currents recorded at  $-62 \text{ mV}$  (Fig. 2). Variance analysis of tail currents gave a total number of  $\text{Ca}^{2+}$  channels  $N$  of  $1175 \pm 96$  ( $n = 17$ ) and  $1848 \pm 80$  ( $n = 11$ ) associated with a single-channel current  $i$  of  $0.32 \pm 0.02 \text{ pA}$  and  $0.51 \pm 0.01 \text{ pA}$  in VHC-I and IHCs, respectively ( $p < 0.05$  for  $N$  and  $i$ ). Using the relationship  $I = i \cdot N \cdot p$ , where  $I$  is the macroscopic tail current, we found an open probability  $p$  of  $0.82 \pm 0.02$  and  $0.81 \pm 0.03$  ( $p_{\text{max}}$  in presence of BayK8644) in VHC-I and IHCs, respectively ( $p = 0.71$ ). Our estimates of channel number and conductance in IHCs are similar to the value previously reported by Brandt et al. (2005). Our present study, constituting the first estimate of the total number of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in VHC-I, indicated that there was  $\sim 36.4\%$  fewer  $\text{Ca}^{2+}$  channels in VHC-I than in IHCs.

Using quantitative immunofluorescent confocal imaging of ribbons stained with a CtBP2 antibody, we then determined the number of synaptic ribbons in each cell type (Fig. 1E'; see Fig. 4). VHC-I displayed nearly twofold fewer ribbons than in IHCs:  $7.4 \pm 0.8$  ( $n = 49$  VHC-I) and  $16.5 \pm 2.5$  ( $n = 16$  IHCs), respectively ( $p < 0.05$ ; Fig. 1E'). These ribbon numbers per IHCs and VHC-I are consistent with the previous findings of Meyer et al. (2009) and Dulon et al. (2009), respectively. Assuming that all  $\text{Ca}^{2+}$  channels are clustered to the ribbons, we calculated a total number of  $158 \pm 12$  and  $110 \pm 5 \text{ Ca}^{2+}$  channels per ribbon in VHC-I and IHCs, respectively ( $p < 0.05$ ). Considering the macroscopic current at  $-10 \text{ mV}$  in 5 mM external  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 1A), the single-channel current, and total number of channels (Fig. 2), we calculated a maximal open probability of  $14.0 \pm 1.0\%$  and  $21.0 \pm 0.9\%$  in VHC-I and IHCs, respectively ( $p < 0.05$ ). A low open probability of  $\text{Ca}^{2+}$  channels similar to VHC-I was previously reported in immature IHCs (Zampini et al., 2010).

Considering their respective open probability at  $-10 \text{ mV}$  in 5 mM external  $\text{Ca}^{2+}$ , we therefore estimated a number of open channels per ribbon synapse that was similar in VHC-I and IHCs ( $22.1 \pm 3.5$  and  $22.3 \pm 1.2$ , respectively,  $p = 0.46$ ). Our results in IHCs are in agreement with those of Brandt et al. (2005) who estimated a total of 80  $\text{Ca}^{2+}$  channels per IHCs synapse in which 20 channels are open simultaneously at  $-20 \text{ mV}$ . Similar numbers were found in frog saccular hair cells (Roberts et al., 1990), turtle cochlear hair cells (Wu et al., 1996), hair cells of the amphibian papillae (Graydon et al., 2011), and salamander cones (Bartoletti et al., 2011), suggesting that there is a rather constant number of  $\text{Ca}^{2+}$  channels per ribbon release site.

By fitting the tail current decay with a single exponential, we found a faster deactivation of  $\text{Ca}^{2+}$  currents in VHC-I than in IHCs ( $0.53 \pm 0.1 \text{ ms}$  and  $1.40 \pm 0.7 \text{ ms}$ , respectively,  $p < 0.001$ ).



**Figure 1.** Kinetics of RRP release in Type I vestibular hair cells (VHC-I, dark blue) and inner hair cells (IHCs, light blue). **A**, IV-ramp activation curve of  $Ca^{2+}$  currents in VHC-I ( $n = 7$ ) and IHCs ( $n = 10$ ) from  $-90$  mV to  $30$  mV ( $1$  mV/ms). Inset,  $Ca^{2+}$  current density relative to cell size (pA/pF). **B**, Examples of  $I_{Ca}$  and capacitance measurements ( $\Delta C_m$ ) in IHCs for  $20$  ms (black) and  $80$  ms (orange) depolarization duration. Cells were depolarized from holding potential  $-80$  mV to  $-10$  mV with various time durations (from  $10$  to  $120$  ms). **C**,  $\Delta C_m$  values were plotted against depolarization duration (top). Data were best fitted with a monoexponential function where  $\tau = 35.7 \pm 5.7$  ms ( $n = 7$ ) and  $\tau = 35.4 \pm 6.3$  ms ( $n = 9$ ) in VHC-I and IHCs, respectively. Bottom,  $Ca^{2+}$  current charge integrals ( $Q_{Ca}$ ) plotted against time (linear fit). **D**,  $\Delta C_m$  values plotted against  $Q_{Ca}$  (data from **C**) were fitted with a simple power function with index of  $0.51$  and  $0.46$  in VHC-I and IHCs, respectively. **E**,  $\Delta C_m$  values plotted against  $Q_{Ca}$  normalized to the number of ribbon (**E'**). **F**,  $\Delta C_m$  values plotted against  $Q_{Ca}$  to cell size (**F'**). Error bars indicate SEM. \* $p < 0.05$ .

These “nonphysiological” slow deactivation time constants are due to the dihydropyridine agonist BayK8644. This molecule has indeed been described to increase the deactivation  $\tau$  decay from  $0.1$  ms to  $1.2$  ms in chick hair cells by Zidanic and Fuchs (1995).

Taken together with a more negative voltage dependence and a lower single-channel current, our results suggest the involvement of different composition of  $Ca^{2+}$  channels in VHC-I, possibly due to the expression of different regulatory subunits and/or

$\alpha$ -subunit isoforms. However, the increased open probability from  $0.14$  or  $0.21$  to  $\sim 0.82$  in the presence of BayK8644 suggests that most of the  $Ca^{2+}$  channels in both VHC-I and IHCs belong to the L-type  $Ca^{2+}$  channel family.

**Kinetics of RRP exocytosis:  $Ca^{2+}$  efficiency and dynamic range**

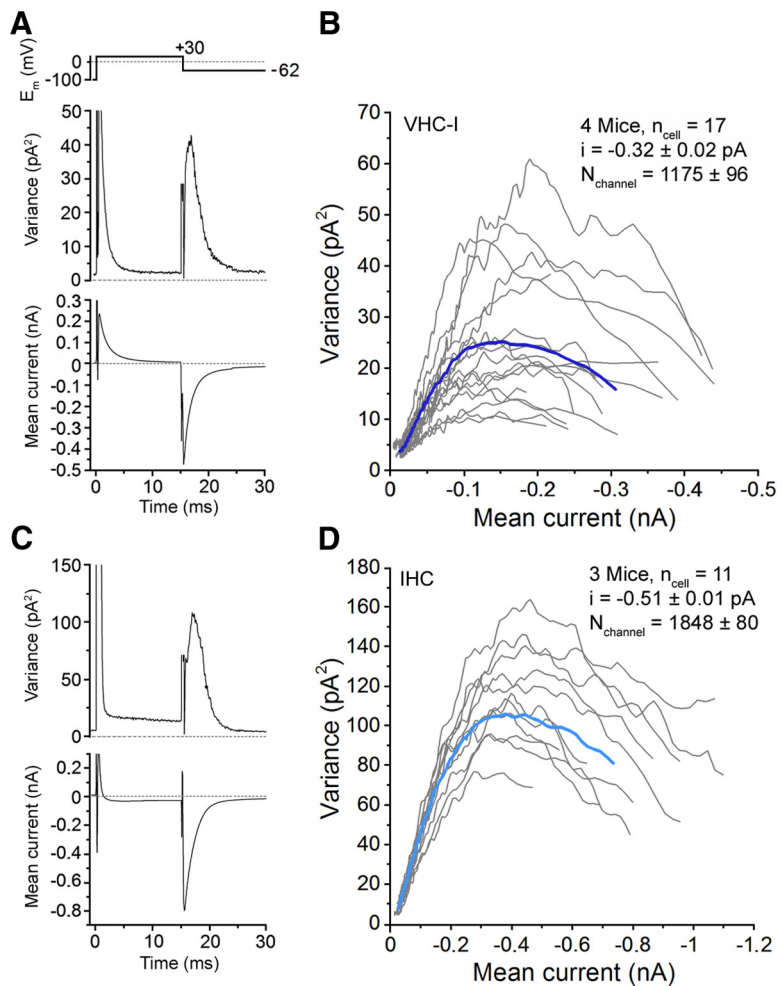
To characterize the dynamics of the readily releasable pool of vesicles (RRP), IHCs and VHC-I were depolarized by a single voltage-step from  $-80$  mV to  $-10$  mV of increasing duration from  $10$  to  $120$  ms (Fig. 1B,C). This single voltage-step to  $-10$  mV was chosen to instantaneously reach maximal voltage activation of  $Ca^{2+}$  channels (Fig. 1A). Increasing the duration of depolarization from  $10$  to  $120$  ms at constant voltage made it possible to compare the  $Ca^{2+}$  sensitivity of RRP exocytosis ( $\Delta C_m$ ) in both types of hair cells in regards to the size of the  $Ca^{2+}$  microdomain, independently of the respective contributions of the number of open channels and  $Ca^{2+}$  flux per channel. Using the data of Wu et al. (1996; their Fig. 3), this protocol would theoretically increase, with  $1$  mM EGTA as diffusible buffer, the size of the  $Ca^{2+}$  domain from a maximal radius of  $450$  nm at  $10$  ms ( $[Ca^{2+}]_i - 450$  nm  $\sim 80$   $\mu M$ ) to  $\sim 1400$  nm at  $120$  ms ( $[Ca^{2+}]_i - 1400$  nm  $\sim 10$   $\mu M$ ). Inside each microdomain,  $[Ca^{2+}]_i$  is considered to drop exponentially with distance from  $Ca^{2+}$  channels (Naraghi and Neher, 1997). Fixed  $Ca^{2+}$  buffers as well as diffusion barriers, such as the docked vesicles and the ribbon itself, would also influence the steady-state  $[Ca^{2+}]$  profile near the  $Ca^{2+}$  channels (Graydon et al., 2011).

The plot of  $\Delta C_m$  as a function of time indicated an exponential rise with similar time constants in VHC-I and IHCs (Fig. 1C;  $\tau = 35.7 \pm 5.7$  ms;  $\tau = 35.4 \pm 6.3$  ms, respectively,  $p = 0.97$ ).  $\Delta C_m$  responses reached a plateau at  $12.58 \pm 2.44$  fF and  $19.87 \pm 2.45$  fF in VHC-I and IHCs ( $p = 0.069$ ), respectively. By normalizing the RRP to their respective number of ribbon, we estimated a similar value of  $1.70 \pm 0.25$  and  $1.19 \pm 0.14$  fF/ribbon in VHC-I and IHCs, respectively ( $p = 0.15$ ). Considering a value of  $34$  aF per vesicle (Lenzi et al., 1999), the total number of vesicles per ribbon involved in the RRP exocytosis was calculated to be  $50.0 \pm 7.4$  and  $34.5 \pm 4.1$  in VHC-I and IHCs, respectively ( $p = 0.15$ ). These values are similar to the  $50$ – $60$  release ready vesicles per synaptic ribbon previously estimated in IHCs (Brandt et al., 2005). Considering a total number of  $158$  and  $110$   $Ca^{2+}$  channels per ribbon synapses in VHC-I and IHCs, respectively, we calculated the involvement of  $\sim 3$   $Ca^{2+}$  channels per vesicle in both cell types. A similar number

of 2–3  $\text{Ca}^{2+}$  channels openings per vesicle fusion event at each ribbon has been previously estimated in salamander cones (Bartoletti et al., 2011).

Remarkably, the  $\text{Ca}^{2+}$  current charge entry ( $Q_{\text{Ca}}$ ), calculated at each step-duration, linearly increased with time in both type of hair cells (Fig. 1C). This indicated the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  current inactivation in both cell types. However, the  $Q_{\text{Ca}}$  increase showed a fourfold smaller slope in VHC-I than in IHCs ( $0.057 \pm 0.005$  pC/ms and  $0.243 \pm 0.026$  pC/ms, respectively;  $p < 0.001$ ). The  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency of exocytosis was then obtained by plotting  $\Delta C_{\text{m}}$  responses as a function of  $Q_{\text{Ca}}$ . Data were fitted with a power function:  $\Delta C_{\text{m}} = y_0 + A [x - x_c]^a$  with  $A = \text{Ca}^{2+}$  efficiency slope;  $x_c = Q_{\text{Ca}}$  threshold,  $a =$  power cooperative index, and  $y_0 =$  initial value. A similar low-power index function with  $a = 0.51 \pm 0.04$  and  $0.46 \pm 0.06$  was found in VHC-I and IHCs, respectively ( $p = 0.45$ ). This convex (super-linear) relationship indicated an apparent noncooperative relationship between exocytosis and cumulative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in both types of hair cells. This convex behavior may be due to the coexistence of two regimes of exocytosis: a regimen based on independent  $\text{Ca}^{2+}$  nanodomains and a regimen based on an increasing  $\text{Ca}^{2+}$  “shell domain” (microdomain) when the activity of the nanodomains overlaps and linearly sums up during long depolarization. A similar sublinear relationship with a power index of  $\sim 0.78$  was reported in auditory hair cells of the bullfrog amphibian papilla when varying external  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations at constant voltage (Cho et al., 2011). A quasi-linear exocytosis was observed in IHCs when varying the number of open  $\text{Ca}^{2+}$  channels, suggesting a nanodomain-like control of exocytosis in these conditions (Johnson et al., 2005; Wong et al., 2014).

We found here that the  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency slope ( $A$ ) was larger in VHC-I than IHCs with  $A = 5.09 \pm 1.19$  fF/pC and  $2.06 \pm 0.69$  fF/pC ( $p < 0.05$ ), respectively (Fig. 1D). Remarkably, the IHCs  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency slope is comparable with the maximum  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency of exocytosis (3.0 fF/pC) found in frog auditory hair cells (Graydon et al., 2011). However, the higher  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency slope that we observed here for VHC-I indicated that the mobilization of the RRP is more efficient in VHC-I than in IHCs. Notably, exocytosis in VHC-I covered a much smaller  $\text{Ca}^{2+}$  dynamic range than in IHCs ( $6.36 \pm 0.59$  pC and  $27.02 \pm 2.87$  pC, respectively;  $p < 0.001$ ). When normalizing  $\Delta C_{\text{m}}$  and  $Q_{\text{Ca}}$  responses to ribbon numbers,  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency of exocytosis per ribbon synapse was estimated to be  $1.73 \pm 0.43$  fF/pC and  $0.68 \pm 0.12$  fF/pC in VHC-I and IHCs, respectively ( $p < 0.05$ ; Fig. 1E). Furthermore, when normalizing  $\Delta C_{\text{m}}$  and  $Q_{\text{Ca}}$  responses to the cell surface membrane area ( $C_{\text{m}}$  in pF),  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency of exocytosis was found to be  $2.08 \pm 0.39$  fF/pC and  $1.03 \pm 0.64$  fF/pC in VHC-I and IHCs, respectively ( $p < 0.05$ ; Fig. 1F). The  $Q_{\text{Ca}}$  dynamic range of exocytosis per ribbon was nearly twofold smaller



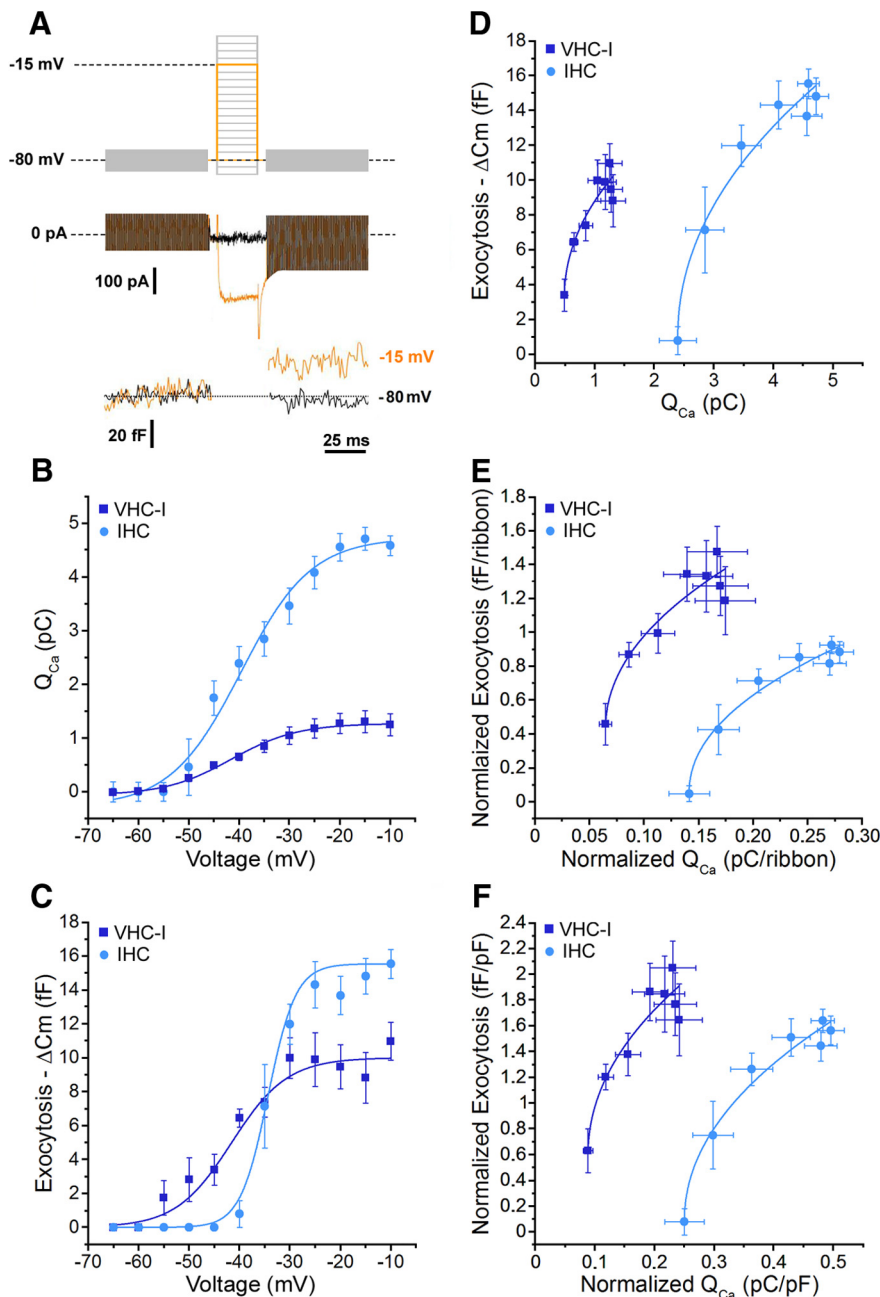
**Figure 2.** Counting  $\text{Ca}^{2+}$  channels in VHC-I and IHCs. Variance analysis of  $\text{Ca}^{2+}$  tail currents were performed from an ensemble of 500 sweeps (interval, 80 ms) after leak subtraction in one example of VHC-I (A) and IHCs (C). The plot of the variance against the current represents a characteristic parabolic relationship in VHC-I (B) and IHCs (D). Gray lines indicate the response of individual cells. Dark blue (VHC-I, B) and light blue (IHCs, D) lines indicate the average of each cell type.  $n_{\text{cell}}$ , Number of cells;  $i$ , unitary current;  $N_{\text{channel}}$ , number of  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Recordings were performed in presence of 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 1 mM  $\text{Ba}^{2+}$ , and 5  $\mu\text{M}$  BayK8644.

in VHC-I ( $0.85 \pm 0.08$  pC/ribbon) than in IHCs ( $1.62 \pm 0.17$  pC/ribbon;  $p < 0.05$ ). Overall, these results showed that the temporal mobilization of RRP vesicles at the ribbon has similar kinetics in VHC-I and IHCs. However, RRP exocytosis in IHCs required a much larger  $\text{Ca}^{2+}$  influx. This could be explained either by a different  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of the exocytotic sensor, by a different  $\text{Ca}^{2+}$  single-channel conductance or by a different spatial organization of  $\text{Ca}^{2+}$  channels with regards to the  $\text{Ca}^{2+}$  sensor. Because VHC-I showed a lower elementary  $\text{Ca}^{2+}$  current with lower open probability, the intrinsic property of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel current could not account for the higher  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency of RRP exocytosis in VHC-I than in IHCs. Therefore, considering a similar number of open  $\text{Ca}^{2+}$  channels per ribbon ( $\sim 22$  at  $-10$  mV), either a sensor with different  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity and/or a different spatial distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  channels could underlie the apparent higher  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency of vesicle recruitment in VHC-I.

#### Voltage dependence of RRP exocytosis: functional organization of $\text{Ca}^{2+}$ channels

The relationship between  $\Delta C_{\text{m}}$  and  $I_{\text{Ca}}$  was then studied when hair cells were step-depolarized to various membrane potentials from  $-90$  mV to 5 mV at a constant 25 ms duration (Fig. 3A). This protocol mainly probed RRP exocytosis by varying





**Figure 3.** Voltage dependence of exocytosis in VHC-I and IHCs. **A**, Cells were depolarized by voltage-steps from  $-90$  mV to  $5$  mV in  $5$  mV increments for a constant  $25$  ms duration. Examples of  $I_{Ca}$  and capacitance measurements ( $\Delta C_m$ ) in an IHCs are shown. **B**,  $Q_{Ca}$  was plotted against membrane potential from  $-65$  mV to  $-10$  mV. Data were fit with a Boltzmann function with a  $V_{1/2}$  of  $-47.8 \pm 1.3$  and  $-38.2 \pm 2.0$  mV in VHC-I ( $n = 6$ ) and IHCs ( $n = 8$ ), respectively. **C**,  $\Delta C_m$  values were plotted against membrane potential. Data were fitted with a Boltzmann function with a  $V_{1/2}$  of  $-42.5 \pm 1.8$  and  $-32.4 \pm 0.5$  mV in VHC-I ( $n = 6$ ) and IHCs ( $n = 8$ ), respectively. **D**,  $\Delta C_m$  values plotted against  $Q_{Ca}$  were fitted with a power function and a power index of  $0.61$  and  $0.49$  in VHC-I ( $n = 6$ ) and IHCs ( $n = 8$ ), respectively. **E**, Normalization to the number of ribbons. **F**, Normalization to cell size (pF).

the open probability of  $Ca^{2+}$  channels in close vicinity to the  $Ca^{2+}$  sensor.

As with the ramp-protocol (Fig. 1A),  $I_{Ca}$  step-activation showed a different voltage dependence in VHC-I and IHCs (Fig. 3B). Indeed, the  $Q_{Ca}$  voltage dependence was best fitted by using a sigmoidal Boltzmann function with a  $V_{1/2}$  of  $-47.76 \pm 1.32$  mV and  $-38.18 \pm 2.00$  mV in VHC-I ( $n = 6$ ) and IHCs ( $n = 8$ ), respectively ( $p < 0.05$ ). Notably, the voltage dependence of  $\Delta C_m$  also indicated a different  $V_{1/2}$  of  $-42.51 \pm 1.79$  mV and  $-32.42 \pm 0.55$  mV in VHC-I and IHCs, respectively ( $p < 0.05$ ;

Fig. 3C). The slope of the Boltzmann function indicated a much steeper voltage dependence in IHCs exocytosis than in VHC-I ( $5.07 \pm 1.79$  fF/mV and  $2.16 \pm 0.19$  fF/mV, respectively;  $p < 0.05$ ). These data suggested that a significant exocytosis can occur at more negative voltage in VHC-I (threshold close to  $-60$  mV) compared with IHCs (threshold close to  $-50$  mV). Notably, auditory hair cells of the amphibian papilla also display  $Ca^{2+}$  current with an activation threshold in the  $-70$  mV range (Graydon et al., 2011). These results suggest that the  $Ca^{2+}$  channels of some hair cells have unusual properties. On the other hand, the voltage exocytotic threshold values of VHC-I fit well with the more negative resting membrane potential in VHC-I (Rüsch et al., 1998; Brichta et al., 2002) ( $\sim -70$  mV) than in IHCs ( $\sim -55$  mV) (Johnson et al., 2011). The steeper voltage dependence of exocytosis in IHCs suggested a higher sensitivity to voltage change in auditory hair cell ribbon synapses than in VHC-I synapses.

The relationship between  $\Delta C_m$  and  $Q_{Ca}$  could be fitted with similar power functions in VHC-I and in IHCs: with a low-power index  $a = 0.61$  and  $0.49$  and a slope  $A$  ( $Ca^{2+}$  efficiency) =  $7.04 \pm 1.39$  fF/pC and  $9.81 \pm 1.22$  fF/pC ( $p = 0.23$ ), respectively (Fig. 3D). A similar  $Ca^{2+}$  efficiency suggests that exocytosis is similarly related to the open probability of  $Ca^{2+}$  channels in both types of hair cells. The nearly linear behavior is compatible with an organization of independent  $Ca^{2+}$  nanodomains whose activities are linearly summing up with voltage. In these nanodomains, the activity of one or few  $Ca^{2+}$  channels (here probably 3) is sufficient to activate the release of a nearby vesicle (Brandt et al., 2005). In addition, the quasi-linear  $Ca^{2+}$ -dependency of exocytosis, when evoked by the activation of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels, has been proposed to result from the summation of the activity of several supralinear ribbons with different  $Ca^{2+}$  sensitivities (Heil and Neubauer, 2010).

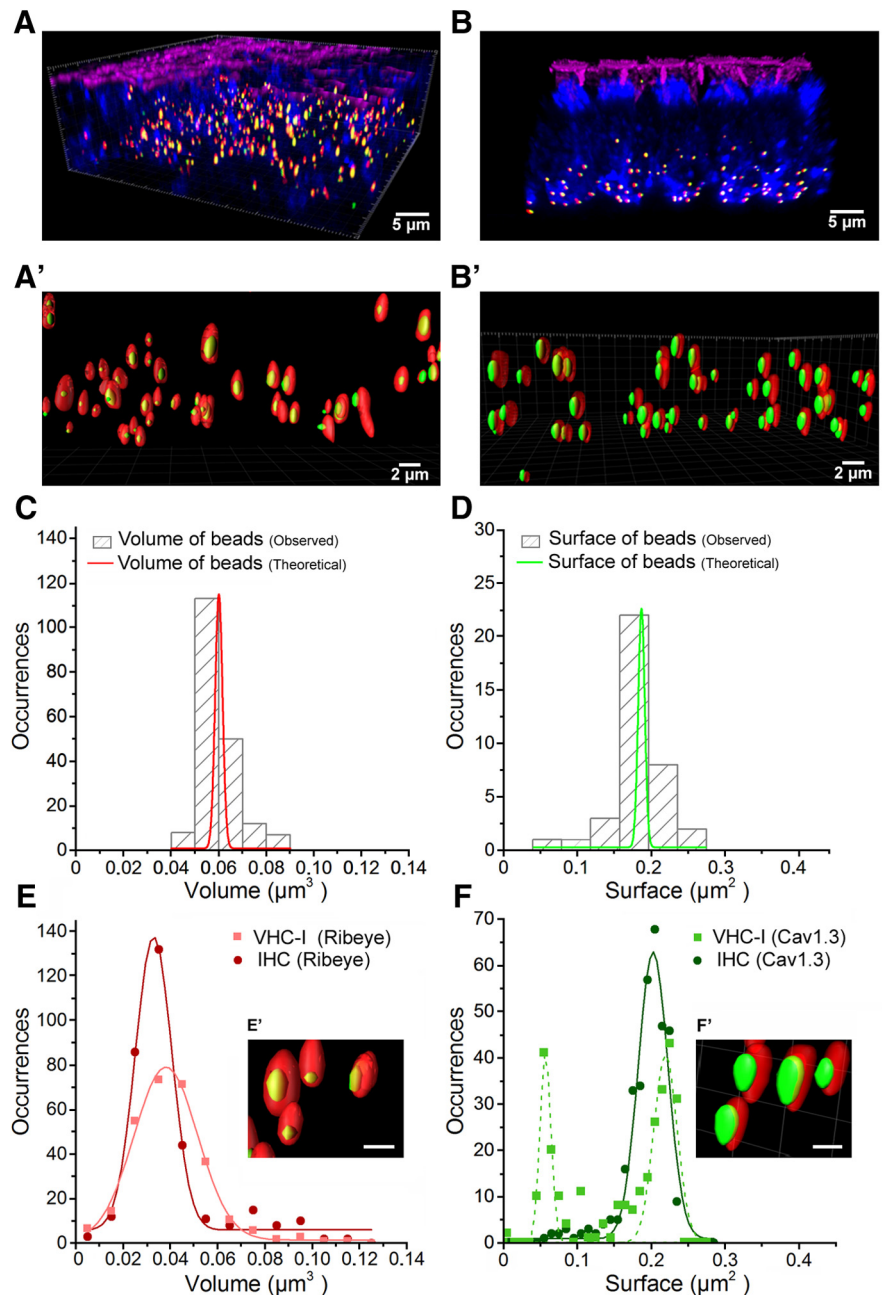
$Q_{Ca}$  thresholds were significantly lower in VHC-I than in IHCs ( $0.49 \pm 0.04$  pC and  $2.33 \pm 0.16$  pC, respectively,  $p < 0.05$ ). Furthermore, the  $Q_{Ca}$  dynamic range covered by VHC-I was much smaller than in IHCs ( $1.0 \pm 0.22$  pC and  $2.19 \pm 0.14$  pC, respectively;  $p < 0.05$ ). When normalized to the number of ribbons per cell, the relationship between  $\Delta C_m$  and  $Q_{Ca}$  showed a similar  $Ca^{2+}$  efficiency of  $3.32 \pm 1.24$  fF/pC and  $2.44 \pm 0.35$  fF/pC in VHC-I and IHCs, respectively;  $p = 0.58$  (Fig. 3E). The  $Q_{Ca}$  thresholds per ribbon were estimated to be  $0.066 \pm 0.005$  pC and  $0.14 \pm 0.01$  pC in VHC-I and IHCs, respectively ( $p < 0.05$ ). The  $Q_{Ca}$  dynamic range per ribbon was  $0.10 \pm 0.01$  pC in VHC-I and  $0.15 \pm 0.02$

pC in IHCs, ( $p < 0.05$ ). Similar results were found when normalizing to cell size (Fig. 3F). Again, the difference in  $Q_{Ca}$  threshold and  $Q_{Ca}$  dynamic range in VHC-I and IHCs could be explained either by a different  $Ca^{2+}$  sensitivity of the  $Ca^{2+}$  sensor and/or a different organization–regulation of  $Ca^{2+}$  channels at the ribbon.

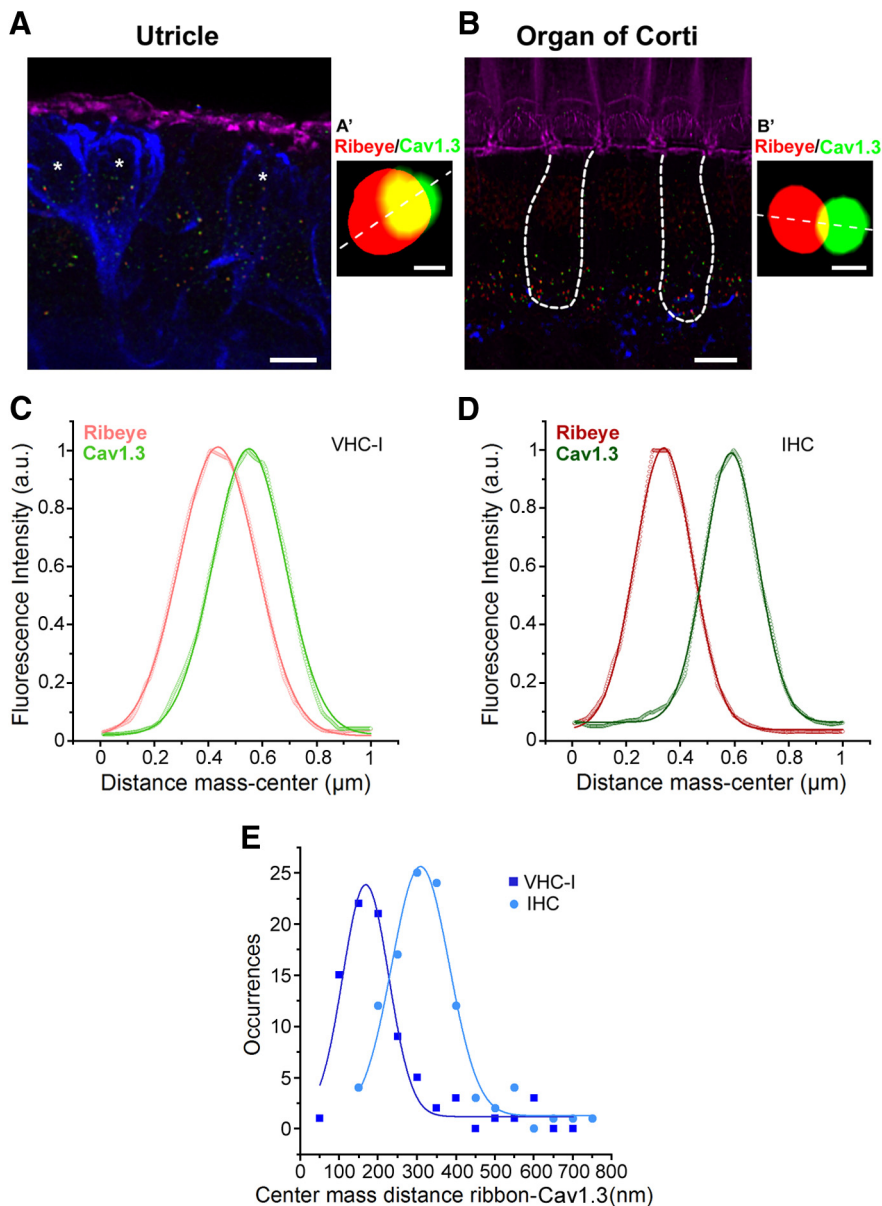
### Spatial organization of Cav1.3 channels

Using fluorescence confocal imaging of immunolabeled whole-mount OC and utricles at P12–P14, we assessed the number of ribbons and distribution of Cav1.3 channels in hair cells (Figs. 1E' and 4). Ribbon synapses were identified as colocalized spots of ribbons (ribeye labeling with anti-CtBP2) and Cav1.3 labeling. As aforementioned in the manuscript, there were nearly twice as many ribbons in IHCs than in VHC-I (Fig. 1E'). However, when normalizing to cell membrane surface ( $C_m$ ), a similar ribbon density of  $1.40 \pm 0.15 \text{ pF}^{-1}$  and  $1.79 \pm 0.07 \text{ pF}^{-1}$  ( $p = 0.13$ ) was found in VHC-I and IHCs, respectively. Assuming a specific membrane capacitance of  $0.01 \text{ pF}/\mu\text{m}^2$ , we estimated the ribbon density to be 1.4 and 1.79 per  $100 \mu\text{m}^2$  in VHC-I and IHCs, respectively.

Imaris analysis of 3D stack reconstruction indicated that the ribbons had a similar size distribution in VHC-I and IHCs, with a mean volume of  $0.038 \pm 0.001 \mu\text{m}^3$  ( $n = 291$ ) and  $0.033 \pm 0.001 \mu\text{m}^3$  ( $n = 333$ ), respectively ( $p = 0.90$ ; Fig. 4E). JaCoP analysis of the nearest neighbor distance distribution between ribbon synapses showed a similar mean distance of  $1362 \pm 88 \text{ nm}$  and  $1174 \pm 58 \text{ nm}$  in VHC-I and IHCs, respectively. The nearly constant distance between ribbons was similar to previous values reported in IHCs (Meyer et al., 2009). Interestingly, we found a greater heterogeneity in the size of the ribbon-associated Cav1.3 channel clusters in VHC-I than in IHCs. In VHC-I, Cav1.3 spots showed a 50/50 distribution in small- ( $0.056 \pm 0.001 \mu\text{m}^2$ ) and large-sized spots ( $0.209 \pm 0.002 \mu\text{m}^2$ ) (Fig. 4F). Cav1.3 spots in IHCs showed a single Gaussian distribution in size ( $0.194 \pm 0.002 \mu\text{m}^2$ ), a value not different from the larger VHC-I Cav1.3 spots ( $p = 0.25$ ). The presence of a large proportion of smaller Cav1.3 spots in VHC-I, giving a global mean surface of  $0.155 \pm 0.004 \mu\text{m}^2$  (i.e., a surface reduction of 20% compared with IHCs, is in good correlation with their smaller  $Ca^{2+}$  current density than in IHCs) (Fig. 1A). Considering a mean number of 158 and 110  $Ca^{2+}$



**Figure 4.** Spatial distribution of Cav1.3 channels in VHC-I and IHCs. **A, B**, 3D Imaparis reconstructions of confocal images from the central striolar region of an utricle and the low-frequency apical turn of an OC, respectively. Both organs were dissected from mice at P14. Hair cells were stained for F-actin (phalloidin, pink), otoferlin (anti-otoferlin, blue), ribbons (anti-CtBP2, red), and Cav1.3 (anti- $\alpha 1D$ , green). **A', B'**, 3D-reconstructed images at higher magnification of some ribbons and their associated Cav1.3 cluster in vestibular (**A'**; VHC-I) and cochlear hair cells (**B'**; IHCs). It is to be noted that these images are 3D stack reconstructions. The distance between ribbons as well as their size are here distorted in 2D representation. **C**, Fluoresbrite YO carboxylate microspheres were taken as reference for the ribbon volume analysis (see Materials and Methods). The hatched gray bars represent the observed volume distribution of the beads (after correction for oblate and prolate image distortion) compared with their theoretical value (red). **D**, Fluoresbrite Yellow Green microspheres were taken as references for the spheroid surface analysis of Cav1.3 clusters. Hatched gray bars represent the observed surface distribution of the bead surfaces compared with their theoretical value (green). **E**, Volume distribution analysis of ribbons in VHC-I (light red, filled squares) and IHCs (dark red, filled circles) displayed no significant difference (VHC-I, 291 ribbons,  $0.038 \pm 0.001 \mu\text{m}^3$ ; IHCs, 333 ribbons,  $0.033 \pm 0.001 \mu\text{m}^3$ ,  $p = 0.90$ ). **F**, Surface distribution analysis of Cav1.3 clusters. In VHC-I, Cav1.3 channel clusters distributed in two equal populations of small ( $0.056 \pm 0.001 \mu\text{m}^2$ ) and large ( $0.209 \pm 0.002 \mu\text{m}^2$ ) clusters (green dashed line). In IHCs, the distribution of Cav1.3 channel clusters was fitted with a simple Gaussian ( $0.194 \pm 0.002 \mu\text{m}^2$ ; dark green). **E', F'**, Insets, Synaptic ribbons at high magnifications in one VHC-I (**E'**) and one IHC (**F'**). Scale bar,  $1 \mu\text{m}$ .



**Figure 5.** Colocalization between Cav1.3 channels and ribbons. **A, B**, 3D stack reconstruction of confocal images of utricle (**A**, striolar region) and OC (apical region, **B**). Organs (P14) were labeled for F-actin (pink), Cav1.3 (green), and CtBP2 (red ribbons). Afferent fibers were labeled with Anti-NF200 (blue). Asterisks indicate VHC-I surrounded by large calyceal nerve terminals. Scale bar, 6  $\mu\text{m}$ . An example of a Cav1.3 channel cluster (green) and its ribbon (red) is shown for VHC-I (**A'**) and IHCs (**B'**). Scale bar, 0.25  $\mu\text{m}$ . **C, D**, Colocalization between Cav1.3 and ribbon (CtBP2-ribeye) was assessed by plotting the fluorescence intensity profile from a line scan (**A'**, **B'**, white dashed line). An example of fluorescence intensity profile is shown for VHC-I (**C**) and IHCs (**D**). **E**, Colocalization analysis using JACoP plugin in ImageJ. Gaussian fit of the occurrences of center mass distance measured between ribbon and Cav1.3 VHC-I ( $167.77 \pm 4.53 \text{ nm}$ ,  $n = 83$ ) and IHCs ( $308.34 \pm 4.68 \text{ nm}$ ,  $n = 106$ ) suggested a tighter organization of Cav1.3 channels and ribbons in VHC-I.

channels per ribbon (with an homogenous  $\text{Ca}^{2+}$  channel distribution between ribbons), we estimated a mean density of 1019 and 567  $\text{Ca}^{2+}$  channels per  $\mu\text{m}^2$  in VHC-I and IHCs active zones, respectively.

Next, we performed a 3D colocalization analysis of Cav1.3 and CtBP2 fluorescent spots using JACoP software. The center mass distances between Cav1.3 and CtBP2 (ribbons) spots were smaller in VHC-I than in IHCs ( $167.8 \pm 4.5 \text{ nm}$ ,  $n = 83$  ribbons; and  $308.4 \pm 4.5 \text{ nm}$ ,  $n = 106$  ribbons;  $p < 0.05$ ; Figure 5). 3D Imaris analysis indicated that  $39.5 \pm 4.0\%$  of the Cav1.3 surface area did not overlap with CtBP2 in IHCs,

whereas the figure was only  $3.5 \pm 3.0\%$  in VHC-I. This difference in the center mass distance may reflect a different ribbon morphology with a more elongated ellipsoid form in IHCs compared with VHC-I. It may also be due to a different arrangement of  $\text{Ca}^{2+}$  channels at the ribbons. However, our optical analysis is hindered by the spatial resolution of confocal microscopy, which is limited to a lateral resolution ( $R$ ) of  $\sim 130\text{--}150 \text{ nm}$  ( $r = 0.37 \lambda_{\text{ex}}/\text{NA}$ ).

To further probe the organization of Cav1.3 channels at a higher spatial resolution we then used STED microscopy in P21 VHC-I and P21 IHCs (Fig. 6). Cav1.3 channels were found to form ellipsoidal patches below the ribbons in IHCs, with semi-major axis ( $a$ ) of  $190 \pm 32 \text{ nm}$  and semi-minor axis ( $b$ ) of  $86 \pm 9 \text{ nm}$ , giving a mean surface area ( $S$ ) of  $0.051 \pm 0.003 \mu\text{m}^2$ . In VHC-I, Cav1.3 channel clusters formed more spherical patches with  $a = 128 \pm 22 \text{ nm}$  and  $b = 110 \pm 20 \text{ nm}$ , giving  $S = 0.042 \pm 0.003 \mu\text{m}^2$  ( $p = 0.45$ ; not significantly different with the  $S$  of IHCs Cav1.3 clusters; Fig. 6E). If we consider that Cav1.3 channels are regularly targeted to the periphery of the ellipse, an elongated ellipse in IHCs predicts that the focus points of interaction of  $\text{Ca}^{2+}$  channels ( $F = \sqrt{a^2 - b^2}$ ) are more distant in IHCs ( $F = 168 \pm 37 \text{ nm}$ ,  $n = 15$ ) than in VHC-I ( $F = 60 \pm 30 \text{ nm}$ ,  $n = 21$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 6F). In this model,  $\text{Ca}^{2+}$  influx from individual channels more efficiently sums up below VHC-I ribbons than in IHCs.

Unlike confocal microscopy performed in P14 VHC-I (Fig. 4), the surface area distribution of Cav1.3 patches is distributed in a single Gaussian in P21 VHC-I (Fig. 6E). The surface areas of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels clusters measured with STED microscopy were found somewhat smaller in both types of hair cells compared with the less resolutive confocal microscopy (Fig. 4). The density of  $\text{Ca}^{2+}$  channels was then estimated here using STED microscopy to be  $\sim 3500$  and  $2150 \text{ Ca}^{2+}$  channels/ $\mu\text{m}^2$  in P21-VHC-I and P21-IHCs, respectively.

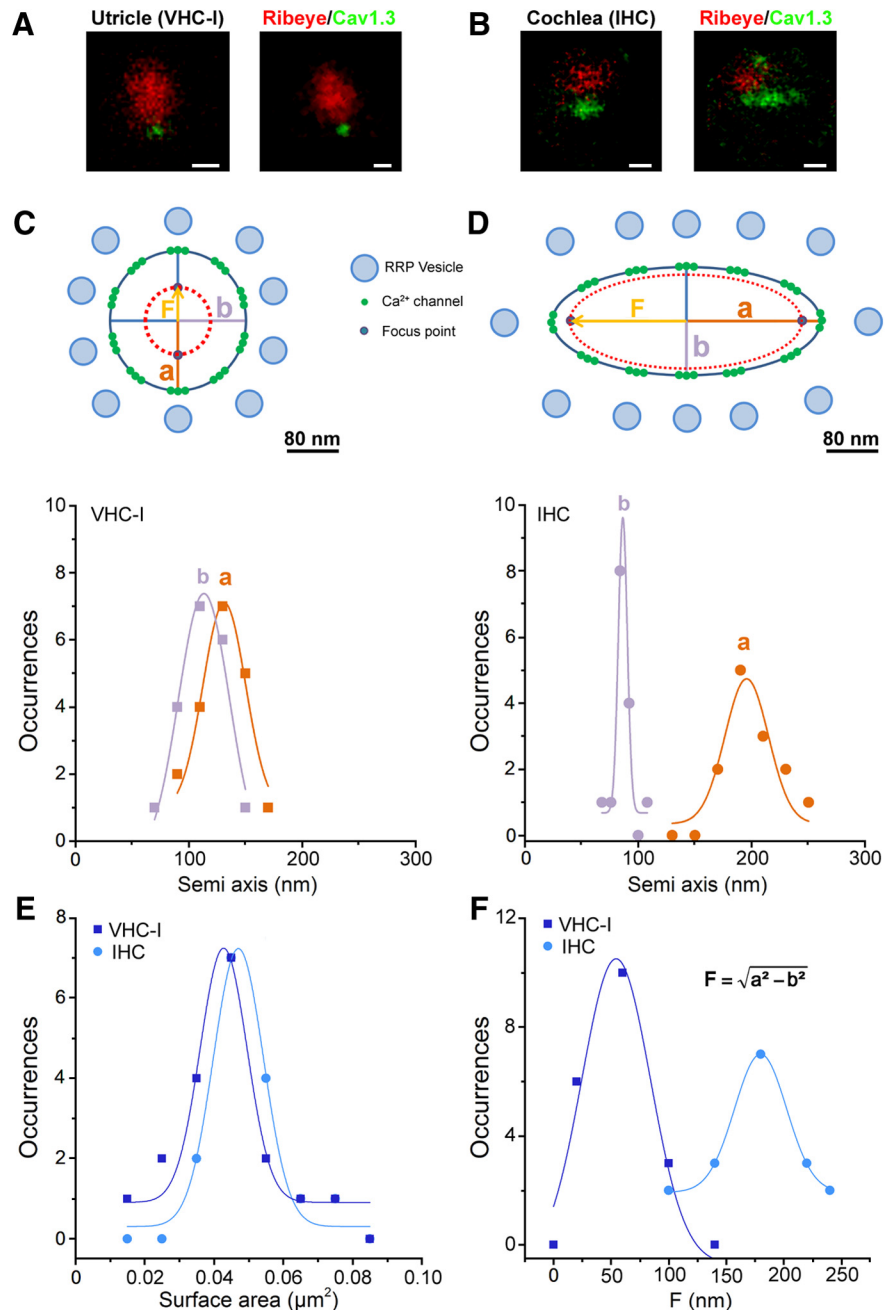
### Probing the coupling between $\text{Ca}^{2+}$ channels and sensors with exogenous $\text{Ca}^{2+}$ chelators

The physical distance between Cav1.3 channels and  $\text{Ca}^{2+}$  release sensors was estimated by analyzing the concentration dependence of intracellular BAPTA and EGTA on hair cell exocytosis (Fig. 7). A similar method has been used to address the same issue in several central synapses (Eggermann et al., 2011). Here, we tested the effects of various concentrations of EGTA and BAPTA on exocytosis ( $\Delta C_m/Q_{\text{Ca}}$ ) evoked by a 25 ms voltage step depo-



larization from  $-80$  mV to  $-10$  mV. We found that the fast  $\text{Ca}^{2+}$  chelator, BAPTA, completely suppressed exocytosis with half-maximal inhibitory concentrations ( $K_i$ ) of  $1.2 \pm 0.2$  mM and  $0.7 \pm 0.2$  mM in VHC-I and IHCs, respectively. Comparable  $K_i$  values for BAPTA were reported in gerbil apical and basal IHCs (Johnson et al., 2008). On the other hand, the slow  $\text{Ca}^{2+}$  chelator, EGTA, only partly reduced exocytosis with a  $K_i$  of  $9.0 \pm 0.7$  and  $2.6 \pm 0.9$  mM in VHC-I and IHCs, respectively ( $p < 0.05$ ; Fig. 7). The lower sensitivity to EGTA in VHC-I argues in favor of a tighter coupling organization between  $\text{Ca}^{2+}$  channels and release sensors compared with IHCs. To evaluate the coupling distance between  $\text{Ca}^{2+}$  channels and release sites, data for EGTA were fit by a model of  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion and buffering (Bucurenciu et al., 2008; Vyleta and Jonas, 2014) (see Materials and Methods). A mean coupling distance of  $72 \pm 20$  nm and  $46 \pm 12$  nm was estimated in IHCs and VHC-I, respectively ( $p < 0.05$ ). It is likely that this coupling distance, evaluated here for a 25 ms step-depolarization during which  $\text{Ca}^{2+}$  has time to diffuse over several hundreds of nm, could rather reflect the mean distance of overlapping individual  $\text{Ca}^{2+}$  nanodomains than the coupling distance between  $\text{Ca}^{2+}$  channels and sensors (Kim et al., 2013). A looser organization of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in IHCs may in part explain the apparent lower  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of exocytosis when considering the global  $\text{Ca}^{2+}$  current in Figure 3. A loose coupling organization of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in IHCs would enable endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  buffers to more efficiently control saturation of the sensors. This would likely allow a more gradual  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked exocytosis in IHCs than in VHC-I and therefore explain the remarkable large dynamic range (up to 40 dB) of sound-evoked discharge rates of individual auditory nerve fibers (Kiang, 1965; Taberner and Liberman, 2005).

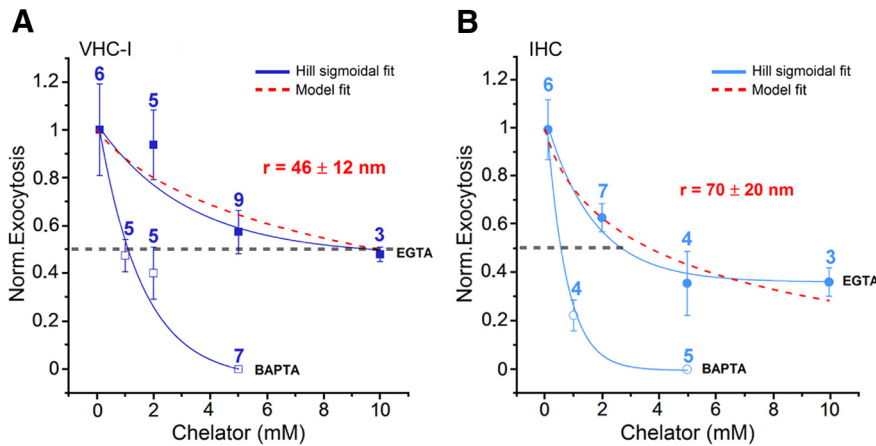
Mouse IHCs and VHC-I exocytosis were here recorded at the onset of cochlear and vestibular potentials, an age at which hair cells are not yet fully mature. However, our conclusions likely also apply to adult hair cells because their fundamental exocytotic properties (rate and calcium dependence) remain largely unchanged after postonset development, as demonstrated in mature IHCs (Johnson et al., 2005; Beurg et al., 2010; Wong et al., 2014) ( $>P20$ – $P25$ ). Furthermore, the STED imaging microscopy experiments in our study were carried out at P21, an age at which VHC-I and IHCs can be considered nearly mature.



**Figure 6.**  $\text{Ca}^{2+}$  channel organization in VHC-I and IHCs by STED microscopy. **A, B**, Two examples of STED images of immunolabeled ribbon (anti-CtBP2, red) and  $\text{Ca}^{2+}$ -channel (anti-Cav1.3 green) in P21 VHC-I (**A**) and P21 IHCs (**B**). Scale bars, 200 nm. **C, D**, Semiaxis (a, b) size distribution in VHC-I (**C**) and IHCs (**D**). Data points were fitted by a simple Gaussian. The long semi-axis “a” and short semi-axis “b” are of similar values in VHC-I (**C**), whereas they show a nearly 2 times difference in IHCs (**D**). This suggested that the arrangement of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels clusters at the ribbon membrane forms an elongated stripe-like ellipsoid in IHCs and a nearly circular disk in VHC-I. **C, D**, Top, Schematic representation of the active zone below the ribbon in VHC-I and IHCs. Assuming that the  $\text{Ca}^{2+}$  channels are uniformly distributed at the edge of the ellipse, an elongated ellipsoid distribution would give a larger distance for the interacting focus points of  $\text{Ca}^{2+}$  influx in IHCs compared with VHC-I. “F” represents the distance between the center of the ellipse and each focus point. The model assumes that  $\text{Ca}^{2+}$  channels are organized as individual nanodomains for brief low-voltage stimulation (near threshold) and as microdomains with linear summation of  $\text{Ca}^{2+}$  activity for long high-voltage stimulations. This summation of  $\text{Ca}^{2+}$  influx would be more efficient in VHC-I than in IHCs. **E**, Similar mean surface distribution of Cav1.3 clusters in VHC-I and IHCs. **F**, Distribution and Gaussian fit of the distance between focus points and the center of the ellipse (“F”) in VHC-I (“F” =  $54.4 \pm 5.9$  nm) and IHCs (“F” =  $179.9 \pm 0.9$  nm).

#### Determination of $\text{Ca}^{2+}$ sensitivity of exocytosis by gradual $\text{Ca}^{2+}$ uncaging

Exposure to 13 sequential low-intensity UV flashes, 200 ms apart, allowed a progressive step-increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and  $C_m$  in both



**Figure 7.** Concentration dependence of exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  chelators.  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency of exocytosis ( $\Delta_{\text{cm}}/Q_{\text{Ca}}$  obtained for a 25 ms depolarization from  $-80$  mV to  $-10$  mV) normalized to the maximum  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency (obtained with  $0.1$  mM BAPTA) as a function of different concentrations of intracellular BAPTA and EGTA in VHC-I (**A**) and IHCs (**B**). The dotted red curves fit EGTA data using the linearized reaction diffusion equations of  $\text{Ca}^{2+}$  described in Materials and Methods. Best fits were obtained with a mean coupling distance between  $\text{Ca}^{2+}$  channels and sensors  $r$  of  $46 \pm 12$  nm (**A**, VHC-I) and  $70 \pm 20$  nm (**B**, IHCs). Solid lines indicate the fit with a Hill sigmoidal function. It is important to note that this coupling distance  $r$  was obtained for a somewhat long 25 ms depolarization at maximal channel open probability. It may likely reflect here the interacting coupling distance between individual  $\text{Ca}^{2+}$  nanodomains described in Figure 6.

VHC-I and IHCs loaded with DM-nitrophen (Fig. 8). A significant  $C_m$  jump began at the fifth flash and reached a similar maximal plateau at  $206.27 \pm 34.31$  fF/pF and  $233.42 \pm 48.89$  fF/pF (normalized to cell capacitance) in VHC-I and IHCs, respectively ( $p = 0.3$ ). After each flash, the kinetics of  $\Delta_{\text{cm}}$  could be decomposed in a fast component that could be attributed to the RRP and a secondary slow component (SRP) that reflects the replenishment of the fusion sites by distant vesicles (Beutner et al., 2001). Similar experiments in *Otof*<sup>-/-</sup> VHC-I and *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs, lacking otoferlin, gave a similar step-increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Fig. 8C,D) but only a weak  $\Delta_{\text{cm}}$  response reaching a maximum of  $12.71 \pm 3.20$  fF/pF and  $2.25 \pm 2.36$  fF/pF in VHC-I and IHCs, respectively (Fig. 8E,F). These results confirmed that otoferlin is essential for efficient fast exocytosis in both VHC-I and IHCs (Roux et al., 2006; Dulon et al., 2009).

To determine the affinity of the  $\text{Ca}^{2+}$  sensor, each  $\Delta_{\text{cm}}$  plateau value was plotted against the corresponding  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in both VHC-I and IHCs (Fig. 9A,B). Data were fitted using a similar Hill sigmoidal function with a  $K_D$  of  $3.27 \pm 0.59$   $\mu\text{M}$  and  $4.05 \pm 0.72$   $\mu\text{M}$  in control VHC-I and IHCs, respectively ( $p = 0.46$ ). A similar cooperative Hill coefficient of  $3.19 \pm 0.69$  and  $2.69 \pm 0.25$ , respectively, was found in VHC-I and IHCs ( $p = 0.19$ ). The instantaneous-rate of the first exocytotic component (RRP), as estimated by linearly fitting the first 10–20 ms of the  $\Delta_{\text{cm}}$  jump, was also plotted against the various  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  obtained at each UV flash (Fig. 9C). Instantaneous rates were also fitted using a similar Hill sigmoidal function with a  $K_D$  of  $1.28 \pm 0.34$   $\mu\text{M}$  and  $1.10 \pm 0.24$   $\mu\text{M}$  in VHC-I and IHCs, respectively ( $p = 0.9$ ). A similar cooperative Hill coefficient of  $3.73 \pm 0.67$  and  $4.12 \pm 0.62$  was found in VHC-I and IHCs, respectively ( $p = 0.5$ ).

We then estimated the rate of the SRP by linearly fitting the first 50 ms after the deflecting point of the  $\Delta_{\text{cm}}$  response at each UV flash (Fig. 9D', inset, black arrowhead). Plotted against the various  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Fig. 9D), the SRP rates could also be fitted using a sigmoidal Hill function with a  $K_D$  of  $3.58 \pm 0.27$   $\mu\text{M}$  and  $1.03 \pm 0.10$   $\mu\text{M}$  in VHC-I and IHCs, respectively ( $p < 0.05$ ). The SRP rates against  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  showed a similar cooperative Hill coefficient

of  $4.22 \pm 0.76$  and  $3.58 \pm 0.54$  in VHC-I and IHCs, respectively ( $p = 0.56$ ). Considering that 94%–98% of the  $\Delta_{\text{cm}}$  response is abolished in *Otof*<sup>-/-</sup> VHC-I and *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (Fig. 9A,B), our results suggested that otoferlin has a  $\text{Ca}^{2+}$  affinity in the low micromolar range.

Surprisingly, previous  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging experiments using a single high-intensity UV flash showed that the exocytotic rate of IHCs does not saturate even at high  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , such as  $100$   $\mu\text{M}$ , rendering difficult to estimate the  $K_D$  value (Beutner et al., 2001; Neef et al., 2014). When using a single high-power intensity UV flash and various concentrations of intracellular DM-nitrophen (2.5, 4, and 10 mM) and  $\text{Ca}^{2+}$  (5 and 10 mM), we also observed a similar apparent nonsaturating exocytotic rate in both VHC-I and IHCs when varying  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  from 1 to 80  $\mu\text{M}$  (data not shown). The discrepancy between results using the multiflash and the single flash protocol could be explained by the following observations. Indeed, we found that

stepping the membrane potential from a holding potential of  $-70$  mV to  $-30$  mV for 500 ms (near  $V_{1/2}$  of  $I_{\text{Ca}}$ ) before a single flash photolysis led to faster release rates and larger RRP exocytosis in IHCs (without prestep: rate constant =  $5.93 \pm 0.70$   $\text{s}^{-1}$  and plateau  $\Delta_{\text{cm}}$  =  $11.02 \pm 2.33$  fF/ribbon and with a prestep, rate constant =  $14.51 \pm 3.97$   $\text{s}^{-1}$  and plateau  $\Delta_{\text{cm}}$  =  $20.36 \pm 3.21$  fF/ribbon,  $p < 0.05$ ; data not shown).

The abovementioned observations suggest that holding the hair cells at a low negative potential of  $-70$  mV possibly impeded the functional  $\text{Ca}^{2+}$  environment of the release sites. It is tempting to speculate that a significant  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity is required to maintain a high density of vesicles at the active zone. Indeed,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent synaptic vesicle trafficking, leading to a superlinear exocytotic component varying with  $\text{Ca}^{2+}$  load (Schnee et al., 2011), has been suggested in hair cells (Cho et al., 2011; Levic et al., 2011). Our multiflash protocol, increasing  $[\text{free Ca}^{2+}]_i$  by steps in the same cell, likely offers the advantage of progressively charging the sites of release with vesicles during the sequential UV flashes. It is possible that a single high energy UV flash from vesicle-depressed ribbons would simultaneously test replenishment and fusion, thereby explaining the nonsaturating exocytotic responses (Beutner et al., 2001). Alternatively, it is possible that part of the nonsaturating exocytotic response, when a single high energy photolysis is used, comes from a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent osmotic-pressure effect on vesicle fusion because DM-nitrophen molecules undergo cleavage to yield two products with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{H}^+$  release (Ellis-Davies et al., 1996).

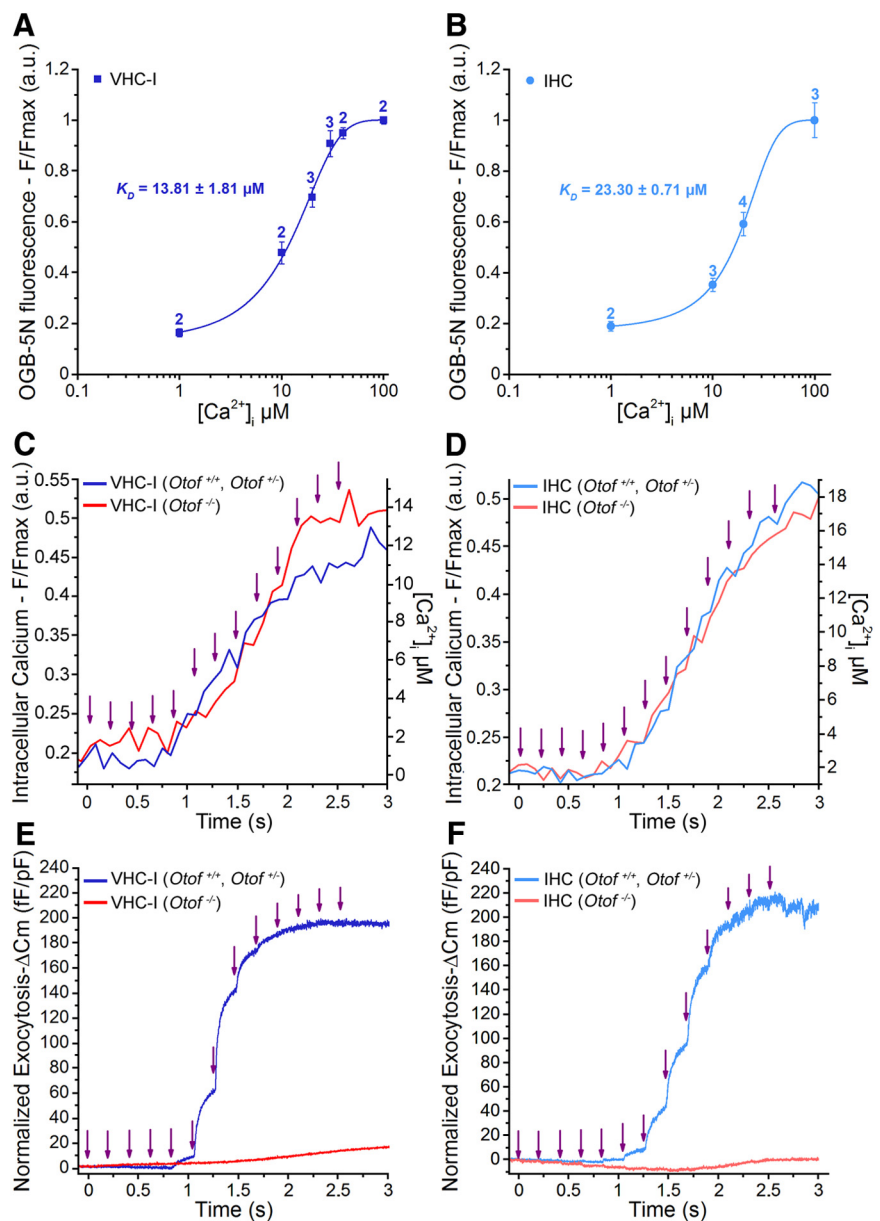
Similarly to Beutner et al. (2001), we found that the maximal instantaneous release rates were more than one order of magnitude higher when using the uncaging  $\text{Ca}^{2+}$  protocol compared with the RRP kinetics experiments with voltage activation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in Figure 1C (VHC-I:  $10.82 \pm 2.40$  pF/s vs  $0.57 \pm 0.23$  pF/s; IHCs:  $11.50 \pm 3.60$  pF/s vs  $0.50 \pm 0.09$  pF/s, respectively). Considering that vesicle fusion occurs exclusively at the ribbon active zone and that  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise uniformly in the hair cells during the uncaging experiments, one can speculate that an elevation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  at large distance from the active zone greatly influences the rate of vesicle fusion. In other words, the pressure

of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent supply of vesicle controls the rate of fusion at the ribbon active zone. It is worth recalling that during the depolarizing-RRP protocol, the  $\text{Ca}^{2+}$  microdomain remains relatively small with a decreasing  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  gradient ranging from  $80 \mu\text{M}$  at  $\sim 10 \text{ nm}$  from the  $\text{Ca}^{2+}$  channels to  $\sim 10 \mu\text{M}$  at  $\sim 1.4 \mu\text{m}$  (Wu et al., 1996). Alternatively or in addition, during the  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging protocols, we cannot exclude the participation of a large extra-ribbon vesicle fusion that speeds up the release rate in both types of hair cells.

### Endocytosis kinetics and $\text{Ca}^{2+}$ dependence

Remarkably, during the multiflash protocol, the instantaneous rate of exocytosis decreased strongly at  $[\text{Ca}^{2+}]_i > 8 \mu\text{M}$  in both types of hair cells (Fig. 8E,F). Considering that a 200 ms period between each stimulation is sufficient to limit vesicle depression (Levic et al., 2011), we speculated that the decrease in  $\Delta C_m$  responses was essentially due to a progressive increase in the endocytotic rate when  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rises  $> 8 \mu\text{M}$ . Fast endocytosis of vesicle has indeed been shown to be triggered during a transient rise in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in many cell types (Beutner et al., 2001; Van Hook and Thoreson, 2012; Wu and Wu, 2014). The fit of our data with a sigmoidal function gave a  $K_D$  of  $7.36 \pm 0.84 \mu\text{M}$  and  $9.79 \pm 1.79 \mu\text{M}$  in VHC-I and IHCs, respectively ( $p = 0.35$ ; Fig. 9E). These results suggested that vesicle endocytosis displays a similar high  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity in VHC-I and IHCs.

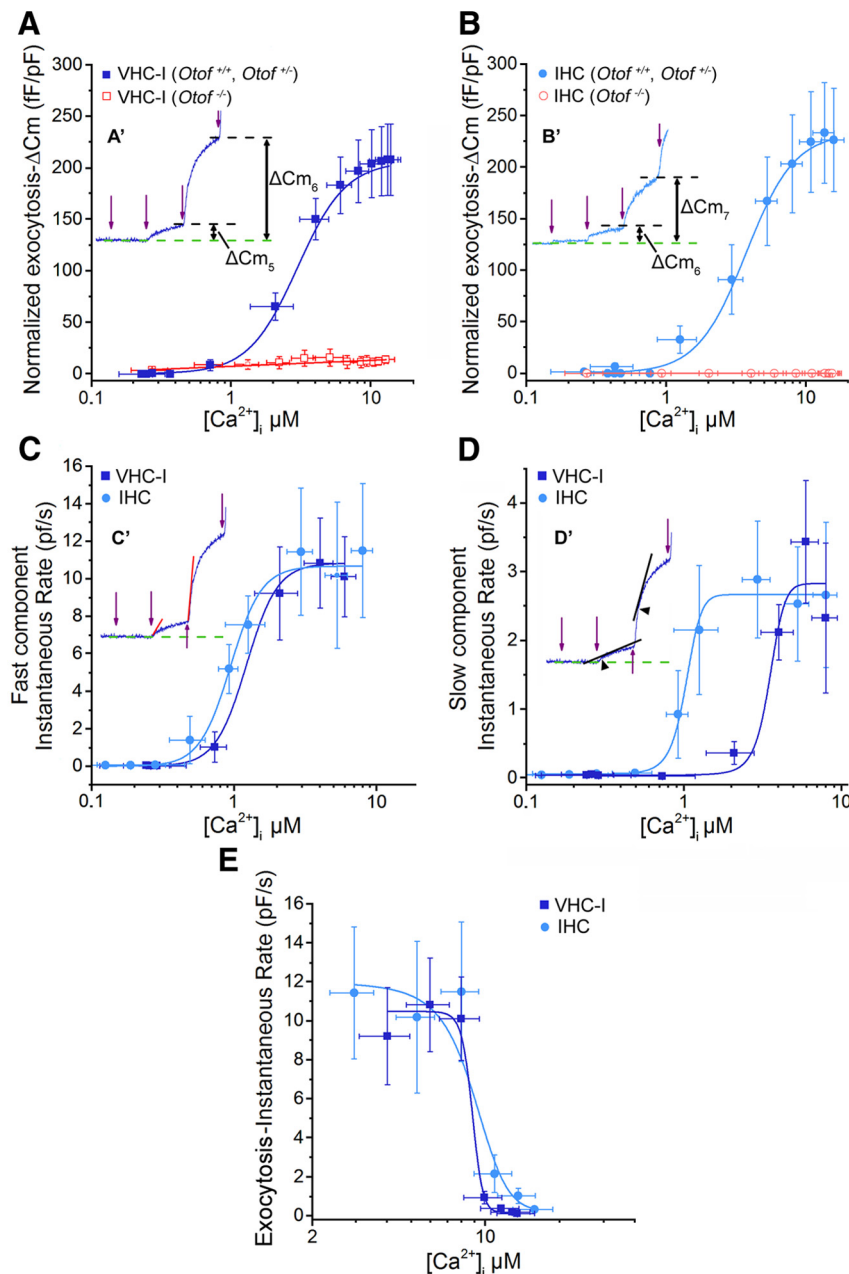
The rate of endocytosis was also studied when applying a single high-energy UV flash in both VHC-I and IHCs loaded with an internal solution with 10 mM DM-nitrophen and 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . The  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was estimated to instantaneously reach a value close to  $80 \mu\text{M}$  as measured with the low affinity  $\text{Ca}^{2+}$  dye Fluo-5N ( $K_D = 90 \mu\text{M}$ ; data not shown). This  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging protocol triggered a fast  $\Delta C_m$  response peaking within 200 ms and reaching a maximum value of  $544 \pm 22 \text{ fF}$  and  $697 \pm 60 \text{ fF}$  in VHC-I and IHCs, respectively (Fig. 10A,B). The exocytotic phase was then followed by a fast decline in  $C_m$  that could be due to endocytotic membrane retrieval as previously described (Beutner et al., 2001). We found that endocytosis displayed an apparent slower instantaneous rate in VHC-I than in IHCs ( $0.18 \pm 0.04 \text{ pf/s}$  and  $1.01 \pm 0.14 \text{ pf/s}$ , respectively,  $p < 0.001$ ; Fig. 10C). However, when normalized to the amplitude of the endocytotic peak, the kinetics of endocytosis showed similar time constants in VHC-I and IHCs ( $1.47 \pm 0.42 \text{ s}^{-1}$  and  $3.10 \pm 0.69 \text{ s}^{-1}$ , respectively,  $p = 0.051$ ; Fig. 10D). *Otof*<sup>-/-</sup> VHC-I and *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs, displaying a reduced exocytotic response, showed apparent slower instantaneous rates than their respective controls ( $0.05 \pm 0.01 \text{ pf/s}$  and  $0.24 \pm 0.09 \text{ pf/s}$ , respectively;  $p < 0.05$ ).



**Figure 8.** Step increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and exocytosis evoked by multiflash  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging. **A, B**, *In vivo* calibration of the calcium dye OGB-5N in VHC-I (**A**) and IHCs (**B**) gave a dissociation constant close to the theoretical value of  $20 \mu\text{M}$  ( $13.81 \mu\text{M}$  VHC-I and  $23.30 \mu\text{M}$  IHCs). Numbers above each data point indicate the number of cells. **C–F**, Simultaneous recording of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $F/F_{max}$ ) and  $\Delta C_m$  (normalized to cell size) during the multiflash protocol (purple arrow indicates each UV flash) in VHC-I (**C, E**) and IHCs (**D, F**). Control VHC-I (dark blue line, mean of  $n = 7$ ) and *Otof*<sup>-/-</sup> VHC-I (red line, mean of  $n = 10$ ); control IHCs (light blue, mean of  $n = 9$ ) and *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (red line, mean of  $n = 7$ ).

However, when normalized to the endocytotic peak amplitude, the endocytotic kinetics of *Otof*<sup>-/-</sup> VHC-I and *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs showed similar time constants to those of controls (VHC-I,  $1.47 \pm 0.42 \text{ s}^{-1}$  and  $0.51 \pm 0.13 \text{ s}^{-1}$ ,  $p = 0.37$ ; IHCs,  $3.10 \pm 0.69 \text{ s}^{-1}$  and  $2.41 \pm 0.60 \text{ s}^{-1}$ ;  $p = 0.55$ ; respectively for controls and *Otof*<sup>-/-</sup>). Furthermore, VHC-I and IHCs lacking otoferlin displayed a similar percentage of membrane retrieval (control VHC-I:  $n = 7$ ,  $35.52 \pm 14.26\%$ , *Otof*<sup>-/-</sup> VHC-I,  $n = 7$ ,  $40.26 \pm 8.93$ ;  $p = 0.8$ ; control IHCs:  $n = 13$ ,  $52.95 \pm 4.43\%$ , KO IHCs,  $n = 7$ ,  $33.09 \pm 13.34\%$ ;  $p = 0.08$ ; Fig. 10E). These results suggested that otoferlin is not essential for the fast endocytotic process in both VHC-I and IHCs, in agreement with Neef et al. (2014).





**Figure 9.** Determination of  $Ca^{2+}$  sensitivity of exocytosis in VHC-I and IHCs. **A, B**, From the experiments of Figure 8, mean  $\Delta C_m$  responses at each UV flash were plotted against corresponding  $[Ca^{2+}]_i$  for VHC-I (**A**) and IHCs (**B**). **A', B'**, Insets,  $\Delta C_m$  after two UV flashes (fifth flash:  $\Delta C_{m5}$  and sixth flash:  $\Delta C_{m6}$ ) in control mice.  $\Delta C_m$  responses in *Otof*<sup>-/-</sup> VHC-I and *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs show a very poor  $Ca^{2+}$  dependence (red lines). **A', B'**, The black dashed lines indicate the  $\Delta C_m$  plateau after each UV flash. Data points were fitted with a Hill sigmoidal function. **C**, The instantaneous rate of the  $\Delta C_m$  fast component after each UV flash was plotted against  $[Ca^{2+}]_i$  for VHC-I (dark blue) and IHCs (light blue). **C'**, Inset, The method used to measure the instantaneous rate of the fast component. We used a linear function to fit the first 20 ms of the capacitance response (red lines). As in **A** and **B**, we used a Hill sigmoidal function to fit these data points. **D**, The second slow component of the  $\Delta C_m$  response was also plotted against  $[Ca^{2+}]_i$ . **D'**, Inset, The method used. We linearly fitted the first 50 ms (black lines) after the deflection point of the response (arrowhead). Data points were fit with a Hill sigmoidal function. **E**, The instantaneous rate of the fast  $\Delta C_m$  responses deeply decreased at  $[Ca^{2+}]_i > 8 \mu M$ . Data points were fitted with a decreasing sigmoidal function to obtain  $K_i$  (constant of inhibition) of exocytosis, which we considered as the  $K_D$  for endocytosis.

**Discussion**

We found that VHC-I and IHC ribbon synapses share several common structural and functional properties: (1) a similar density of ribbons (relative to cell membrane surface) as well as a similar ribbon size and interdistance interval distribution; (2) an otoferlin-dependent exocytosis with similar high intrinsic

$Ca^{2+}$  sensitivity; and (3) an otoferlin-independent endocytosis with similar kinetics and  $Ca^{2+}$  dependence. Conversely, we found fundamental differences that essentially concern the functional organization of  $Ca^{2+}$  channels: (1) the  $Ca^{2+}$  channel density; (2) the voltage dependence of  $Ca^{2+}$ -currents and exocytosis; and (3) the spatial organization of Cav1.3 channels at the ribbons.

**The synaptic ribbons**

First described by Smith and Sjostrand (1961), these electron-dense bodies, to which hundreds of synaptic vesicles aggregate, are thought to be the main sites where conventional synaptic chemical transmission occurs in hair cells. At the ultrastructural level, VHC-I ribbons have been described to have a spheroid form (Wersäll et al., 1967; Favre and Sans, 1979), whereas IHC ribbons display an elongated plate-like form (Sobkowicz et al., 1982). The IHC ribbons facing high-spontaneous rate fibers tend to be shorter and rounder than those facing low-spontaneous rate fibers but have a similar overall volume (Kantardzhieva et al., 2013). Our study showed that mouse VHC-I and IHC ribbons display a similar volume distribution, suggesting that a similar number of vesicles are attached to them. This hypothesis was reinforced by our findings that the RRP per ribbon in both VHC-I and IHCs is of similar size. These results are consistent with previous ultrastructural studies showing a rather constant density of vesicles tethered to the ribbons whatever the type of hair cells, such as frog vestibular hair cells (Lenzi et al., 1999), turtle auditory hair cells (Schnee et al., 2005), and cat IHCs (Kantardzhieva et al., 2013).

An intriguing finding was that VHC-I and IHCs display a similar ribbon density (relative to cell membrane surface), suggesting that the hair cell rather than the morphology of the postsynaptic nerve fiber determines the occurrence and the distribution of each ribbon. Furthermore, the 3D interdistance between ribbons was similar in both types of hair cells (i.e., 1.2–1.4  $\mu m$ ), suggesting that each ribbon tends to regulate the occurrence of other ribbons in its vicinity. A similar distribution of the nearest neighboring distance between ribbons has been reported in

high- and low-frequency mouse IHCs (Meyer et al., 2009).

**$Ca^{2+}$  sensitivity of otoferlin-dependent exocytosis**

Our multistep  $Ca^{2+}$  uncaging experiments showed that otoferlin-dependent exocytosis in VHC-I and IHCs displays a comparable high  $Ca^{2+}$  sensitivity with  $K_D$  within the micromolar

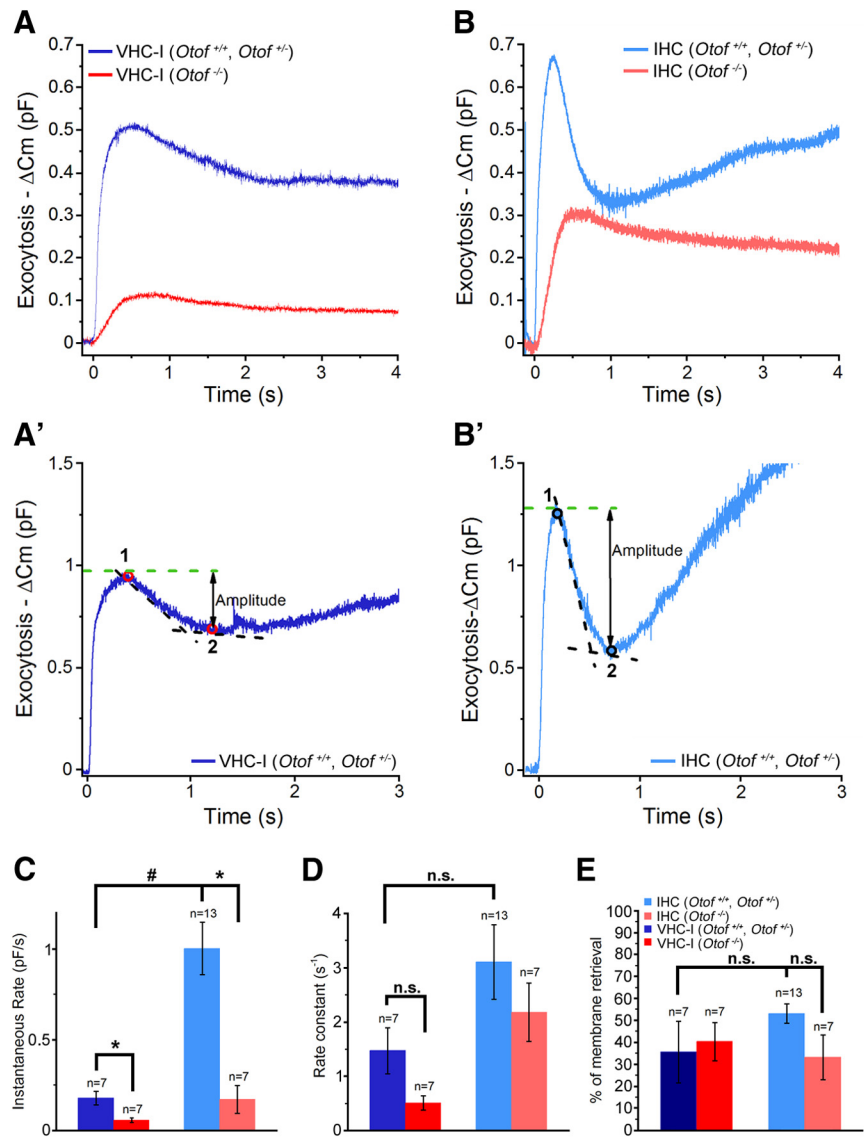
range between 1 and 4  $\mu\text{M}$ . In addition, both cell types exhibit a similar  $\text{Ca}^{2+}$  cooperativity with a Hill coefficient between 3 and 4. These results are in good agreement with the data of Johnson and Chapman (2010) showing that, *in vitro*, otoferlin C2 domains accelerate fusion of liposomes bearing SNARE with high  $\text{Ca}^{2+}$  affinity with a  $K_D$  near 2  $\mu\text{M}$ . This apparent  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of otoferlin is nearly one order of magnitude greater than that reported for synaptotagmin I (Brose et al., 1992; Davis et al., 1999). Notably, synaptotagmin I is transiently expressed in immature spiking IHCs before the onset of hearing (Beurg et al., 2010; Safieddine et al., 2012). A lower-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  sensor, such as synaptotagmin I, in addition to a loose distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  channels at the ribbons (Wong et al., 2014), may contribute to the nonlinear low  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency of exocytosis in early immature IHCs.

What can hair cells gain from having a high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  sensor? Considering that otoferlin is involved in both the vesicular fusion and the resupply process (Roux et al., 2006; Pangrsic et al., 2010), a high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  sensor would not only be instantaneously saturated near the  $\text{Ca}^{2+}$  channels but also be effectively activated at large distance from the active zone (i.e., at low micromolar  $\text{Ca}^{2+}$  concentration for an effective vesicle recruitment). The duality of this  $\text{Ca}^{2+}$  sensing process, possibly placing the vesicle resupply as the rate-limiting step, would allow both VHC-I and IHCs to sustain transmitter release during long stimulations.

### $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and otoferlin-independent fast endocytosis

Sustained high rates of vesicle fusion at the hair cell synapses imply a fast mechanism of endocytosis (Beutner et al., 2001; Neef et al., 2014). Here, we found that both VHC-I and IHCs displayed fast endocytotic properties with rather similar time constants. An apparent  $\text{Ca}^{2+}$  affinity ranging between 7 and 10  $\mu\text{M}$  was estimated in both types of hair cells. Furthermore, we found that the relative endocytotic rate was unaffected in VHC-I and IHCs lacking otoferlin. These results suggested that the fast endocytotic process does not require otoferlin.

Otoferlin is thought to couple clathrin-mediated endocytosis in mature IHCs (Duncker et al., 2013). However, endocytosis associated with the coating activity of clathrin proteins appears too slow to entirely equilibrate the extremely high rate of exocytotic vesicle fusion in hair cells. Therefore, this clathrin-mediated process might represent only a slow component of hair cell endocytosis. Other fast mechanisms, such as bulk endocytosis, probably take place in hair cells (Neef et al., 2014).



**Figure 10.** Endocytosis in VHC-I and IHCs. **A**, A single high-intensity UV flash rising [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> near 80  $\mu\text{M}$  (data not shown) produced a large  $\Delta\text{Cm}$  response in control VHC-I (dark blue line, mean of 7 cells) and a reduced  $\Delta\text{Cm}$  response in *Otof*<sup>-/-</sup> VHC-I (red line, mean of 7 cells). **B**, Same as in **A** but in control IHCs (light blue line, mean of 13 cells) and in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (red line, mean of 7 cells). **A'**, **B'**, Example of endocytosis in VHC-I and IHCs, respectively. Endocytosis was essentially analyzed as described by Neef et al. (2014). Briefly, the amplitude of fast endocytosis was measured as the difference between the maximum  $\Delta\text{Cm}$  ("1") and the point where the rate of endocytosis is reduced to 5% of the instantaneous rate ("2"). To calculate the endocytotic instantaneous rate, we used a linear fit function at the point giving the faster rate between point "1" and point "2". **C**, Histogram plot of the endocytotic instantaneous rate obtained in each group. We found a reduced instantaneous rate in *Otof*<sup>-/-</sup> VHC-I compared with VHC-I controls ( $p = 0.011$ ) but also in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs compared with IHCs controls ( $p = 0.006$ ). **D**, Rate constants were obtained after normalizing the instantaneous rate to the amplitude of endocytosis. No statistical differences were found between control and *Otof*<sup>-/-</sup> mice (VHC-I,  $p = 0.051$ ; IHCs,  $p = 0.55$ ). **E**, Percentage of membrane retrieval at the point corresponding to 5% of the maximal instantaneous rate (point "2") normalized by the amplitude of exocytosis ( $(\text{"1"} - \text{"2"})/\text{"1"} \times 100$ ). The absence of otoferlin did not interfere with the endocytotic capability of VHC-I and IHCs. **C–E**, Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ . # $p < 0.001$ . n.s., No statistical difference.

### $\text{Ca}^{2+}$ channel density and spatial organization at the ribbon synapses

Previous studies in *Cav1.3*<sup>-/-</sup> mice have shown that Cav1.3 channels carry ~90% of total  $\text{Ca}^{2+}$  currents in IHCs (Platzner et al., 2000; Brandt et al., 2003). In vestibular hair cells, only 50% of total  $\text{Ca}^{2+}$  currents are driven by Cav1.3 channels (Dou et al., 2004). Additional calcium channels, such as T-type (Nie et al., 2008), N-type (Su et al., 1995), and/or R-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels (Martini et al., 2000), probably take part in the VHC-I  $\text{Ca}^{2+}$



influx. Here, we found that  $\text{Ca}^{2+}$  currents and exocytosis in VHC-I showed a voltage dependence that was shifted by  $\sim 10$  mV toward negative potentials compared with IHCs. A similar highly negative voltage dependence of  $\text{Ca}^{2+}$  currents has been described in mouse (Bao et al., 2003), rat (Almanza et al., 2003), and chicken VHC-I (Zampini et al., 2006). Because VHC-I have a highly negative resting potential because of their specific large  $\text{K}^+$  conductance  $g_{\text{K,L}}$  (Rüsch et al., 1998; Brichta et al., 2002), low-voltage activated  $\text{Ca}^{2+}$  currents would facilitate quantal transmission in these cells. Hair cells from the bullfrog amphibian papilla also display  $\text{Ca}^{2+}$  current with highly negative voltage dependence and multiquantal release can be triggered at these very negative hair cell membrane potentials (Li et al., 2009; Graydon et al., 2011).

The manner in which auditory and vestibular hair cell afferent ribbon synapses encode different sensory mechanical signals is not well understood. In particular, auditory hair cell synapses discriminate and encode complex acoustic signals over a wide range of frequencies (20 Hz to 20 kHz, in human) and across a wide dynamic range of sound intensity (0–120 dB SPL) by modulating their firing rate from a few 10s of Hertz to 1 kHz (Kiang, 1965; Taberner and Liberman, 2005). Vestibular hair cell synapses primarily code for head velocity over a low-frequency range by modulating their firing rate with short-term dynamics above and below a high resting level of 30–100 spikes/s (Goldberg and Fernandez, 1971; Yang and Hullar, 2007). In addition to conventional cochlear-like afferent bouton terminals on Type II hair cells, the mammalian vestibular epithelia have large afferent calyx terminals that surround VHC-I (Wersäll, 1956; Lysakowski and Goldberg, 2008). Furthermore, VHC-I calyx transmission is thought to involve not only a conventional quantal glutamatergic release but also a nonquantal component likely mediated by ephaptic electric coupling and/or by  $\text{K}^+$  accumulation in the large calyceal synaptic cleft (Holt et al., 2007; Songer and Eatock, 2013). The role of non-quantal transmission is unknown, but it could boost signaling speed and/or participate in maintaining the resting firing frequency of the calyceal afferent fibers.

Are the mechanisms of glutamatergic vesicular release similar in cochlear and vestibular hair cells? Remarkably, we found that voltage-activated RRP exocytosis displayed higher  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity in VHC-I than in IHCs. This is likely because of a tighter spatial organization of  $\text{Ca}^{2+}$  channels at the VHC-I ribbons rather than to a different intrinsic  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of the sensor. A looser coupling of  $\text{Ca}^{2+}$  channels likely allows a better tuning by endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  buffers as suggested at hippocampal synapses (Vyleta and Jonas, 2014). This organization might produce a more efficient gradual summation of  $\text{Ca}^{2+}$  at the IHC active zone (Kim et al., 2013), thereby explaining the larger firing dynamic range of auditory fibers compared with vestibular fibers. Coupling of  $\text{Ca}^{2+}$  influx changes with IHC development (Wong et al., 2014) and also varies between low-threshold and high-threshold ribbon synapses (Frank et al., 2009). A loose coupling organization associated with a relatively low level of endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  buffering proteins in IHCs (Hackney et al., 2005) may also be essential for an efficient recruitment of a distant vesicular resupply machinery. In conclusion, our findings suggest that auditory bouton synapses and vestibular calyceal synapses tune their synaptic firing properties by varying spatial distribution and gating of  $\text{Ca}^{2+}$  channels at their hair cell pre-synaptic ribbons rather than by using a different  $\text{Ca}^{2+}$  sensor.

## References

- Almanza A, Vega R, Soto E (2003) Calcium current in type I hair cells isolated from the semicircular canal crista ampullaris of the rat. *Brain Res* 994:175–180. [CrossRef Medline](#)
- Bao H, Wong WH, Goldberg JM, Eatock RA (2003) Voltage-gated calcium channel currents in type I and type II hair cells isolated from the rat crista. *J Neurophysiol* 90:155–164. [CrossRef Medline](#)
- Bartoletti TM, Jackman SL, Babai N, Mercer AJ, Kramer RH, Thoreson WB (2011) Release from the cone ribbon synapse under bright light conditions can be controlled by the opening of only a few  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J Neurophysiol* 106:2922–2935. [CrossRef Medline](#)
- Beurg M, Michalski N, Safieddine S, Bouleau Y, Schneggenburger R, Chapman ER, Petit C, Dulon D (2010) Control of exocytosis by synaptotagmins and otoferlin in auditory hair cells. *J Neurosci* 30:13281–13290. [CrossRef Medline](#)
- Beutner D, Voets T, Neher E, Moser T (2001) Calcium dependence of exocytosis and endocytosis at the Cochlear inner hair cell afferent synapse. *Neuron* 29:681–690. [CrossRef Medline](#)
- Bolte S, Cordelières FP (2006) A guided tour into subcellular co-localization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224:213–232. [CrossRef Medline](#)
- Brandt A, Striessnig J, Moser T (2003)  $\text{Ca(V)}1.3$  channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 23:10832–10840. [Medline](#)
- Brandt A, Khimich D, Moser T (2005) Few  $\text{Ca(V)}1.3$  channels regulate the exocytosis of a synaptic vesicle at the hair cell ribbon synapse. *J Neurosci* 25:11577–11585. [CrossRef Medline](#)
- Brichta AM, Aubert A, Eatock RA, Goldberg JM (2002) Regional analysis of whole cell currents from hair cells of the turtle posterior crista. *J Neurophysiol* 88:3259–3278. [CrossRef Medline](#)
- Brose N, Petrenko AG, Südhof TC, Jahn R (1992) Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256:1021–1025. [CrossRef Medline](#)
- Brown AM, Kunze DL, Yatani A (1984) The agonist effect of dihydropyridines on  $\text{Ca}^{2+}$ -channels. *Nature* 311:570–572. [CrossRef Medline](#)
- Bucurenciu I, Kulik A, Schwaller B, Frotscher M, Jonas P (2008) Nanodomain coupling between  $\text{Ca}^{2+}$  channels and  $\text{Ca}^{2+}$  sensors promotes fast and efficient transmitter release at a cortical GABAergic synapse. *Neuron* 57:536–545. [CrossRef Medline](#)
- Cho S, Li GL, von Gersdorff H (2011) Recovery from short-term depression and facilitation is ultrafast and  $\text{Ca}^{2+}$  dependent at auditory hair cell synapses. *J Neurosci* 31:5682–5692. [CrossRef Medline](#)
- Davis AF, Bai J, Fasshauer D, Wolowick MJ, Lewis JL, Chapman ER (1999) Kinetics of synaptotagmin responses to  $\text{Ca}^{2+}$  and assembly with the core SNARE complex onto membranes. *Neuron* 24:363–376. [CrossRef Medline](#)
- Di Biase V, Obermair GJ, Szabo Z, Altier C, Sanguesa J, Bourinet E, Flucher BE (2008) Stable membrane expression of postsynaptic  $\text{Ca(V)}1.2$  calcium channel clusters is independent of interactions with AKAP79/150 and PDZ proteins. *J Neurosci* 28:13845–13855. [CrossRef Medline](#)
- Dou H, Vazquez AE, Namkung Y, Chu H, Cardell EL, Nie L, Parson S, Shin HS, Yamoah EN (2004) Null mutation of  $\alpha(1D)$   $\text{Ca}^{2+}$  channel gene results in deafness but no vestibular defect in mice. *J Assoc Res Otolaryngol* 5:215–226. [CrossRef Medline](#)
- Dulon D, Safieddine S, Jones SM, Petit C (2009) Otoferlin is critical for a highly sensitive and linear calcium-dependent exocytosis at vestibular hair cell ribbon synapses. *J Neurosci* 29:10474–10487. [CrossRef Medline](#)
- Duncker SV, Franz C, Kuhn S, Schulte W, 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. [CrossRef Medline](#)
- Eatock RA, Songer JE (2011) Vestibular hair cells and afferents: two channels for head motion signals. *Annu Rev Neurosci* 34:501–534. [CrossRef Medline](#)
- Eggermann E, Bucurenciu I, Goswami SP, Jonas P (2011) Nanodomain coupling between  $\text{Ca}^{2+}$  channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nat Rev Neurosci* 13:7–21. [CrossRef Medline](#)
- Ehret G (1983) Development of hearing and response behavior to sound stimuli: behavioral studies. In: *Development of auditory and vestibular systems* (Romand R, ed), pp 211–234. San Diego: Academic.
- Ellis-Davies GC, Kaplan JH, Barsotti RJ (1996) Laser photolysis of caged calcium: rates of calcium release by nitrophenyl-EGTA and DM-nitrophen. *Biophys J* 70:1006–1016. [CrossRef Medline](#)

- Favre D, Sans A (1979) Morphological changes in afferent vestibular hair cell synapses during the postnatal development of the cat. *J Neurocytol* 8:765–775. [CrossRef Medline](#)
- Frank T, Khimich D, Neef A, Moser T (2009) Mechanisms contributing to synaptic  $\text{Ca}^{2+}$  signals and their heterogeneity in hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4483–4488. [CrossRef Medline](#)
- Fuchs PA (2005) Time and intensity coding at the hair cell's ribbon synapse. *J Physiol* 566:7–12. [CrossRef Medline](#)
- Glowatzki E, Fuchs PA (2002) Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci* 5:147–154. [CrossRef Medline](#)
- Goldberg JM, Fernandez C (1971) Physiology of peripheral neurons innervating semicircular canals of the squirrel monkey: I. Resting discharge and response to constant angular accelerations. *J Neurophysiol* 34:635–660. [Medline](#)
- Goutman JD, Glowatzki E (2007) Time course and calcium dependence of transmitter release at a single ribbon synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16341–16346. [CrossRef Medline](#)
- Grant L, Yi E, Glowatzki E (2010) Two modes of release shape the postsynaptic response at the inner hair cell ribbon synapse. *J Neurosci* 30:4210–4220. [CrossRef Medline](#)
- Graydon CW, Cho S, Li GL, Kachar B, von Gersdorff H (2011) Sharp  $\text{Ca}^{2+}$  nanodomains beneath the ribbon promote highly synchronous multivesicular release at hair cell synapses. *J Neurosci* 31:16637–16650. [CrossRef Medline](#)
- Hackney CM, Mahendrasingam S, Penn A, Fettiplace R (2005) The concentrations of calcium buffering proteins in mammalian cochlear hair cells. *J Neurosci* 25:7867–7875. [CrossRef Medline](#)
- Hall JD, Betarbet S, Jaramillo F (1997) Endogenous buffers limit the spread of free calcium in hair cells. *Biophys J* 73:1243–1252. [CrossRef Medline](#)
- Heil P, Neubauer H (2010) Summing across different active zones can explain the quasi-linear  $\text{Ca}^{2+}$ -dependencies of exocytosis by receptor cells. *Front Synaptic Neurosci* 2:148. [CrossRef Medline](#)
- Holt JC, Chatlani S, Lysakowski A, Goldberg JM (2007) Quantal and non-quantal transmission in calyx-bearing fibers of the turtle posterior crista. *J Neurophysiol* 98:1083–1101. [CrossRef Medline](#)
- Huterer M, Cullen KE (2002) Vestibuloocular reflex dynamics during high-frequency and high-acceleration rotations of the head on body in rhesus monkey. *J Neurophysiol* 88:13–28. [Medline](#)
- Johnson CP, Chapman ER (2010) Otoferlin is a calcium sensor that directly regulates SNARE-mediated membrane fusion. *J Cell Biol* 191:187–197. [CrossRef Medline](#)
- Johnson SL, Marcotti W, Kros CJ (2005) Increase in efficiency and reduction in  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of exocytosis during development of mouse inner hair cells. *J Physiol* 563:177–191. [CrossRef Medline](#)
- Johnson SL, Forge A, Knipper M, Münkner S, Marcotti W (2008) Tonic variation in the calcium dependence of neurotransmitter release and vesicle pool replenishment at mammalian auditory ribbon synapses. *J Neurosci* 28:7670–7678. [CrossRef Medline](#)
- 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. [CrossRef Medline](#)
- Jones TA, Jones SM (2007) Vestibular evoked potentials. In: *Auditory evoked potentials: basic principles and clinical application* (Burkard RF, Eggermont JJ, Don M, eds). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Kantardzhieva A, Liberman MC, Sewell WF (2013) Quantitative analysis of ribbons, vesicles, and cisterns at the cat inner hair cell synapse: correlations with spontaneous rate. *J Comp Neurol* 521:3260–3271. [CrossRef Medline](#)
- Kiang NY (1965) *Discharge patterns of single fibers in the cat's auditory nerve*. Cambridge, MA: Massachusetts Institute of Technology.
- Kim MH, Li GL, von Gersdorff H (2013) Single  $\text{Ca}^{2+}$  channels and exocytosis at sensory synapses. *J Physiol* 591:3167–3178. [Medline](#)
- Lai SK, Lai CH, Tse YC, Yung KK, Shum DK, Chan YS (2008) Developmental maturation of ionotropic glutamate receptor subunits in rat vestibular nuclear neurons responsive to vertical linear acceleration. *Eur J Neurosci* 28:2157–2172. [CrossRef Medline](#)
- Lenzi D, Runyeon JW, Crum J, Ellisman MH, Roberts WM (1999) Synaptic vesicle populations in saccular hair cells reconstructed by electron tomography. *J Neurosci* 19:119–132. [Medline](#)
- Levic S, Bouleau Y, Dulon D (2011) Developmental acquisition of a rapid calcium-regulated vesicle supply allows sustained high rates of exocytosis in auditory hair cells. *PLoS One* 6:e25714. [CrossRef Medline](#)
- Li GL, Keen E, Andor-Ardó D, Hudspeth AJ, von Gersdorff H (2009) The unitary event underlying multiquantal EPSCs at a hair cell's ribbon synapse. *J Neurosci* 29:7558–7568. [CrossRef Medline](#)
- Liberman LD, Wang H, Liberman MC (2011) Opposing gradients of ribbon size and AMPA receptor expression underlie sensitivity differences among cochlear-nerve/hair-cell synapses. *J Neurosci* 31:801–808. [CrossRef Medline](#)
- Liberman MC, Dodds LW, Pierce S (1990) Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 301:443–460. [CrossRef Medline](#)
- Lysakowski A, Goldberg JM (2008) Ultrastructural analysis of the cristae ampullares in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Comp Neurol* 511:47–64. [CrossRef Medline](#)
- Lysakowski A, Gaboyard-Niay S, Calin-Jageman I, Chatlani S, Price SD, Eatock RA (2011) Molecular microdomains in a sensory terminal, the vestibular calyx ending. *J Neurosci* 31:10101–10114. [CrossRef Medline](#)
- Martini M, Rossi ML, Rubbini G, Rispoli G (2000) Calcium currents in hair cells isolated from semicircular canals of the frog. *Biophys J* 78:1240–1254. [CrossRef Medline](#)
- Meyer AC, Frank T, Khimich D, Hoch G, Riedel D, Chaponnikov NM, Yarin YM, Harke B, Hell SW, Egner A, Moser T (2009) Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. *Nat Neurosci* 12:444–453. [CrossRef Medline](#)
- Naraghi M, Neher E (1997) Linearized buffered  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion in microdomains and its implications for calculation of  $\text{Ca}^{2+}$  at the mouth of a calcium channel. *J Neurosci* 17:6961–6973. [Medline](#)
- Neef J, Jung S, Wong AB, Reuter K, Pangrsic T, Chakrabarti R, Kügler S, Lenz C, Nouvian R, Boumil RM, Frankel WN, Wichmann C, Moser T (2014) Modes and regulation of endocytic membrane retrieval in mouse auditory hair cells. *J Neurosci* 34:705–716. [CrossRef Medline](#)
- Neher E (1998) Usefulness and limitations of linear approximations to the understanding of  $\text{Ca}^{2+}$  signals. *Cell Calcium* 24:345–357. [CrossRef Medline](#)
- Nie L, Zhu J, Gratton MA, Liao A, Mu KJ, Nonner W, Richardson GP, Yaomoah EN (2008) Molecular identity and functional properties of a novel T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel cloned from the sensory epithelia of the mouse inner ear. *J Neurophysiol* 100:2287–2299. [CrossRef Medline](#)
- Palmer AR, Russell IJ (1986) Phase-locking in the cochlear nerve of the guinea-pig and its relation to the receptor potential of inner hair cells. *Hear Res* 24:1–15. [CrossRef Medline](#)
- Pangrsic T, Lasarow L, Reuter K, Takago H, Schwander M, Riedel D, Frank T, Tarantino LM, Bailey JS, Strenzke N, Brose N, Müller U, Reisinger E, Moser T (2010) Hearing requires otoferlin-dependent efficient replenishment of synaptic vesicles in hair cells. *Nat Neurosci* 13:869–876. [CrossRef Medline](#)
- 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  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Cell* 102:89–97. [CrossRef Medline](#)
- Rennie KJ, Streeter MA (2006) Voltage-dependent currents in isolated vestibular afferent calyx terminals. *J Neurophysiol* 95:26–32. [CrossRef Medline](#)
- Roberts WM, Jacobs RA, Hudspeth AJ (1990) Co-localization of ion channels involved in frequency-selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. *J Neurosci* 10:3664–3684. [Medline](#)
- 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. [CrossRef Medline](#)
- Rüsch A, Lysakowski A, Eatock RA (1998) Postnatal development of type I and type II hair cells in the mouse utricle: acquisition of voltage-gated conductances and differentiated morphology. *J Neurosci* 18:7487–7501. [Medline](#)
- Safieddine S, El-Amraoui A, Petit C (2012) The auditory hair cell ribbon synapse: from assembly to function. *Annu Rev Neurosci* 35:509–528. [CrossRef Medline](#)
- Schnee ME, Ricci AJ (2003) Biophysical and pharmacological characterization of voltage-gated calcium currents in turtle auditory hair cells. *J Physiol* 549:697–717. [CrossRef Medline](#)

- Schnee ME, Lawton DM, Furness DN, Benke TA, Ricci AJ (2005) Auditory hair cell-afferent fiber synapses are specialized to operate at their best frequencies. *Neuron* 47:243–254. [CrossRef Medline](#)
- Schnee ME, Santos-Sacchi J, Castellano-Muñoz M, Kong JH, Ricci AJ (2011) Calcium-dependent synaptic vesicle trafficking underlies indefatigable release at the hair cell afferent fiber synapse. *Neuron* 70:326–338. [CrossRef Medline](#)
- Smith CA, Sjostrand FS (1961) Structure of the nerve endings on the external hair cells of the guinea pig cochlea as studied by serial sections. *J Ultrastruct Res* 5:523–556. [CrossRef Medline](#)
- Sobkowitz HM, Rose JE, Scott GE, Slapnick SM (1982) Ribbon synapses in the developing intact and cultured organ of Corti in the mouse. *J Neurosci* 2:942–957. [Medline](#)
- Songer JE, Eatock RA (2013) Tuning and timing in mammalian type I hair cells and calyceal synapses. *J Neurosci* 33:3706–3724. [CrossRef Medline](#)
- Su ZL, Jiang SC, Gu R, Yang WP (1995) Two types of calcium channels in bullfrog saccular hair cells. *Hear Res* 87:62–68. [CrossRef Medline](#)
- Taberner AM, Liberman MC (2005) Response properties of single auditory nerve fibers in the mouse. *J Neurophysiol* 93:557–569. [CrossRef Medline](#)
- Van Hook MJ, Thoreson WB (2012) Rapid synaptic vesicle endocytosis in cone photoreceptors of salamander retina. *J Neurosci* 32:18112–18123. [CrossRef Medline](#)
- Vyleta NP, Jonas P (2014) Loose coupling between Ca<sup>2+</sup> channels and release sensors at a plastic hippocampal synapse. *Science* 343:665–670. [CrossRef Medline](#)
- Wersäll J (1956) Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampullares in the guinea pig: a light and electron microscopic investigation. *Acta Otolaryngol Suppl* 126:1–85. [Medline](#)
- Wersäll J, Gleisner L, Lundquist PG (1967) Vestibular mechanism: fine structure. Ultrastructure of the vestibular end organs. *Ciba Found Symp* 105–120.
- Wong AB, Rutherford MA, Gabrielaitis M, Pangrsic T, Göttfert F, Frank T, Michanski S, Hell S, Wolf F, Wichmann C, Moser T (2014) Developmental refinement of hair cell synapses tightens the coupling of Ca<sup>2+</sup> influx to exocytosis. *EMBO J* 33:247–264. [CrossRef Medline](#)
- Wu XS, Wu LG (2014) The yin and yang of calcium effects on synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci* 34:2652–2659. [CrossRef Medline](#)
- Wu YC, Tucker T, Fettiplace R (1996) A theoretical study of calcium microdomains in turtle hair cells. *Biophys J* 71:2256–2275. [CrossRef Medline](#)
- Yang A, Hullar TE (2007) Relationship of semicircular canal size to vestibular-nerve afferent sensitivity in mammals. *J Neurophysiol* 98:3197–3205. [CrossRef Medline](#)
- Zampini V, Valli P, Zucca G, Masetto S (2006) Single-channel L-type Ca<sup>2+</sup> currents in chicken embryo semicircular canal type I and type II hair cells. *J Neurophysiol* 96:602–612. [CrossRef Medline](#)
- Zampini V, Johnson SL, Franz C, Lawrence ND, Münkner S, Engel J, Knipper M, Magistretti J, Masetto S, Marcotti W (2010) Elementary properties of Ca(V)<sub>1.3</sub> Ca<sup>2+</sup> channels expressed in mouse cochlear inner hair cells. *J Physiol* 588:187–199. [CrossRef Medline](#)
- Zidanic M, Fuchs PA (1995) Kinetic analysis of barium currents in chick cochlear hair cells. *Biophys J* 68:1323–1336. [CrossRef Medline](#)

## **Article 2**

### **Transient and Sustained Exocytosis at the Auditory Hair Cell Ribbon Synapse Involve Different Cav1.3 Channel Isoforms**

**Philippe FY Vincent**, Yohan Bouleau, Gilles Charpentier, Alice Emptoz, Saaid Safieddine,  
Christine Petit and Didier Dulon (2015). En préparation

## **Introduction**

L'exocytose des cellules ciliées met en jeu deux composantes vésiculaires. La première implique la fusion rapide et transitoire des vésicules amorcées à la membrane formant le RRP (Readily Releasable Pool). La seconde composante correspond au recrutement de vésicules localisées plus ou moins loin des sites de fusion (SRP, Slowly Releasable Pool). La question était de savoir comment ces deux composantes sont régulées par les canaux calciques Cav1.3 dans les CCI. Nous avons étudié la participation possible de certaines isoformes du canal Cav1.3 dans la régulation spécifique du RRP et du SRP, ainsi que leur interaction possible avec l'otoferline.

## **Résultats**

- En présence de 20  $\mu$ M de nifédipine en extracellulaire, 25 % du courant calcique persiste (courant nifédipine résistant).
- Ce courant nifédipine résistant, présente un profil d'inactivation rapide proche des isoformes courtes Cav1.3<sub>43S</sub> et Cav1.3<sub>42A</sub>. Ce courant résiduel en présence de nifédipine est suffisant pour déclencher la fusion normale du RRP. Cependant le recrutement vésiculaire lors d'un train de dépolarisation est aboli.
- Par RT-PCR, nous démontrons que les CCI expriment les isoformes courtes Cav1.3<sub>43S</sub> et Cav1.3<sub>42A</sub> en plus des isoformes longues Cav1.3<sub>42L</sub> et Cav1.3 <sub>$\Delta$ 44</sub>. Ces isoformes courtes seraient à l'origine du courant nifédipine résistant.
- De manière remarquable, l'amplitude du courant nifédipine résistant est réduite d'environ 70 % chez les CCI n'exprimant pas l'otoferline (*Otof*<sup>-/-</sup>). Les CCI *Otof*<sup>-/-</sup> présentent une large diminution de l'expression des isoformes courtes Cav1.3<sub>43S</sub> et Cav1.3<sub>42A</sub> du canal Cav1.3, confirmant leur participation dans le courant nifédipine résistant à inactivation rapide.

## **Conclusion**

Les CCI utilisent deux pools différents de canaux Cav1.3:

- 1) Les isoformes courtes (Cav1.3<sub>43S</sub> et Cav1.3<sub>42A</sub>) contrôlant la fusion du RRP. Leur expression est dépendante de l'otoferline.
- 2) Les isoformes longues (Cav1.3<sub>42L</sub> et Cav1.3 <sub>$\Delta$ 44</sub>) sont impliquées dans la régulation du recrutement vésiculaire.

Nous rappelons que l'inactivation rapide des isoformes courtes Cav1.3<sub>43S</sub> et Cav1.3<sub>42A</sub> est due à l'absence des domaines régulateurs (PCRD et DCRD) dans la partie C-terminale, au niveau duquel la fixation du complexe Ca<sup>2+</sup>-calmoduline est facilitée. Cette inactivation rapide dépendante du Ca<sup>2+</sup> des isoformes courtes du canal Cav1.3 permet une régulation rapide du RRP dans les CCI.

**TRANSIENT AND SUSTAINED EXOCYTOSIS AT THE AUDITORY HAIR CELL  
RIBBON SYNAPSE INVOLVE DIFFERENT Cav1.3 CHANNEL ISOFORMS**

**Philippe FY Vincent<sup>1</sup>, Yohan Bouleau<sup>1</sup>, Gilles Charpentier<sup>1</sup>, Alice Emptoz<sup>2</sup>,  
Saaid Safieddine<sup>2</sup>, Christine Petit<sup>2,3</sup> and Didier Dulon<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Université de Bordeaux, Institut des Neurosciences de Bordeaux, Equipe Neurophysiologie de la Synapse Auditive, Inserm, Unité Mixte de Recherche en Santé 1120, Centre Hospitalier Universitaire hôpital Pellegrin, 33076 Bordeaux, France,

<sup>2</sup>Institut Pasteur et Université Pierre et Marie Curie, Unité de Génétique et Physiologie de l'Audition, Inserm Unité Mixte de Recherche en Santé 1120, 75015 Paris, France

<sup>3</sup>Collège de France, 75005 Paris, France

Corresponding authors: [didier.dulon@inserm.fr](mailto:didier.dulon@inserm.fr) or [philippe.vincent@inserm.fr](mailto:philippe.vincent@inserm.fr)

Authors' contributions: P.F.Y.V. and D.D. designed the research, P.F.Y.V., Y.B., G.C., A.E. and D.D. performed the research; P.F.Y.V., Y.B., G.C., S.S., C.P. and D.D. analyzed the data; P.F.Y.V. and D.D. wrote the paper.

**ABSTRACT**

The mechanisms orchestrating the transient and sustained exocytotic components of auditory inner hair cells (IHCs) remain largely unknown. Both of these components are believed to mobilize sequentially a readily releasable pool of vesicles (RRP) near the synaptic ribbons and a secondary releasable pool of vesicles (SRP) further from them. They are both governed by Cav1.3 channels and require otoferlin as  $\text{Ca}^{2+}$  sensor but whether they use the same Cav1.3 isoforms is still unknown. Here, we show that only a proportion (~25 %) of the total  $\text{Ca}^{2+}$  current in IHCs displaying fast inactivation and resistance to 20  $\mu\text{M}$  nifedipine is sufficient to trigger RRP but not SRP exocytosis. This transient nifedipine-resistant  $\text{Ca}^{2+}$  current is likely conducted by short C-terminal isoforms of Cav1.3 channels, notably Cav1.3<sub>42A</sub> and Cav1.3<sub>43S</sub>, since their mRNA are highly expressed in wild-type IHCs but poorly expressed in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs, the latter having  $\text{Ca}^{2+}$  currents with considerably reduced inactivation. Nifedipine-resistant RRP exocytosis was poorly affected by 5 mM intracellular EGTA, suggesting that the Cav1.3 short isoforms are closely associated with the release site at the synaptic ribbons. Conversely, our results suggest that Cav1.3 long isoforms, which carry ~75 % of the total IHC  $\text{Ca}^{2+}$  current with slow inactivation, high sensitivity to nifedipine and to internal EGTA, are essentially involved in recruiting SRP vesicles. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  imaging showed that Cav1.3 long isoforms support a deep intracellular diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$ . Although most of these Cav1.3 long isoforms are clustered at the ribbon, few of them were found at extrasynaptic zones below the IHC cuticular plate.



## INTRODUCTION

The ribbon synapses of auditory inner hair cells (IHCs) encode critical information on sound timing and intensity into a specific afferent discharge rate that shows fast onset, rapid adaptation and a sustained pattern as long as the sound signal is maintained (Kiang, 1965). To perform this neural encoding faithfully, IHCs use two key elements at their ribbon active zones: Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels, which provide a fast focalized voltage-gated Ca<sup>2+</sup> entry (Brandt *et al.*, 2005; Frank *et al.*, 2009; Vincent *et al.*, 2014) and otoferlin, a large six-C2 domain protein, which acts as a high affinity Ca<sup>2+</sup> sensor that controls vesicle fusion (Roux *et al.*, 2006; Beurg *et al.*, 2010). Exocytosis at this synapse displays a fast component reflecting the fusion of a readily releasable pool of vesicles (RRP) tethered to the ribbon and a slowly releasable pool (SRP) corresponding to the recruitment of distant vesicles (Moser and Beutner, 2000; Spassova *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005). Both exocytotic components are Ca<sup>2+</sup>-dependent and require otoferlin as Ca<sup>2+</sup> sensor (Pangrisc *et al.*, 2010; Levic *et al.*, 2011; Vincent *et al.*, 2014) but whether they involve similar Cav1.3 Ca<sup>2+</sup>-channels remains to be investigated.

In numerous tissues, the transcripts of Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels can undergo extensive alternative splicing that modifies their gating properties, in particular in the C terminus region (Bock *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013). Notably, two Cav1.3 splice variants with early termination of the C terminus have been shown to yield to Cav1.3<sub>42A</sub> and Cav1.3<sub>43S</sub> isoforms. These short isoforms form Cav1.3 channels are endowed with extremely fast inactivation and low sensitivity to dihydropyridine drugs (Huang *et al.*, 2013). Interestingly, Cav1.3<sub>42A</sub> mRNA transcripts have been detected in the mouse organ of Corti (Singh *et al.*, 2008) but their putative role in IHC exocytosis has not been investigated. In the present study, we used the different dihydropyridine sensitivity between Cav1.3 long and short isoforms to probe their specific role in IHC exocytosis. We also used the property of nifedipine to be instantaneously switched into an ineffective nitroso-compound upon UV-flash illumination (Morad *et al.*, 1983; Sanguinetti and Kass, 1984; Feldmeyer *et al.*, 1995) to investigate the sequential role of long and short C-terminal isoforms of Cav1.3 channels in RRP and SRP exocytosis. Furthermore, since Cav1.3 channels and otoferlin are thought to interact physically at the synapse (Ramakrishnan *et al.*, 2009), the expression of these Cav1.3 isoforms was also investigated in mouse IHCs lacking otoferlin.

## MATERIAL AND METHODS

### Tissue preparation

Experiments were performed in accordance with the guidelines of the Animal Care Committee of the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and the ethics committee of the University of Bordeaux. All mice (C57BL6 of either sex) were anesthetized by intraperitoneal injection of xylazin (6 mg/ml) and ketamin (80 mg/ml) mixture (Sigma Aldrich, St Louis, USA) diluted in physiological saline. Cochlear organs were dissected from littermate controls (*Otof*<sup>+/+</sup>, *Otof*<sup>+/-</sup>), here termed *wild type* (WT), or from knock-out otoferlin C57BL6 mice (*Otof*<sup>-/-</sup>) as previously described (Vincent *et al.*, 2014).

Electrophysiological recordings from inner hair cells (IHCs) were obtained in whole-mount organs of Corti from mice at postnatal day 14-18 (P14-P18), i.e. after the onset of hearing. The organ of Corti (OC) was freshly dissected under binocular magnification in an extracellular solution maintained at 4°C containing (in mM): NaCl 135; KCl 5.8; CaCl<sub>2</sub> 1.3; MgCl<sub>2</sub> 0.9; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.7; Glucose 5.6; Na pyruvate 2; HEPES 10, pH 7.4, 305 mOsm. The tectorial membrane was carefully removed. The OC was placed in a recording chamber and the hair cells were observed with a 60x water immersion objective (CFI Fluor 60X W NIR, WD = 2.0 mm, NA = 1) attached to an upright Nikon FN1 microscope. The extracellular solution was complemented with 0.25 μM of apamin (Latoxan, Valence, France) and 0.2 μM of XE-991 (Tocris Bioscience, Lille, France) to block SK channels and KCNQ4 channels, respectively. The external Ca<sup>2+</sup> concentration was increased from 1.3 mM to 5 mM in order to enhance the amplitude of Ca<sup>2+</sup> currents. All experiments were carried out at room temperature (22-24 °C)

### Whole cell recording and capacitance measurement

All IHC recordings were performed in the 20-40% normalized distance from the apex, an area coding for frequencies ranging from 8 to 16 kHz, by using an EPC10 amplifier controlled by Patchmaster pulse software (HEKA Elektronik, Germany). Patch pipettes were pulled with a micropipette Puller P-97 Flaming/Brown (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) and fire-polished with a Micro forge MF-830, (Narishige, Japan) to obtain a resistance range from 3 to 5 MΩ. Patch pipettes were filled with an intracellular solution containing (in mM): CsCl 145; MgCl<sub>2</sub> 1; HEPES 5; EGTA 1; TEA 20, pH 7.2, 300 mOsm. In a few experiments, the slow Ca<sup>2+</sup> chelator EGTA was increased to 5 mM.

*Ramp stimulation:* Cells were held at -80 mV and depolarized from -90 mV to +30 mV in 120 ms giving a slope of voltage change of 1 mV/ms.

*Real-time capacitance measurement:* membrane capacitance measurements (C<sub>m</sub>) were performed using the Patchmaster Lock-in amplifier software (HEKA) as previously described (Vincent *et al.*, 2014). We used a recruitment voltage depolarizing protocol to probe both the vesicular RRP fusion and the recruitment of SRP vesicles at the active zones. This protocol consisted in a train of 100 ms-repetitive voltage steps from -80 mV to -10 mV, each stimulation being separated by a 100 ms interval.

### Nifedipine experiments

*Flash photo-inactivation of nifedipine:* We used the property of nifedipine to be inactivated by UV light (Morad *et al.*, 1983; Feldmeyer *et al.*, 1995) to restore the Ca<sup>2+</sup> current instantaneously in IHCs. Ca<sup>2+</sup> currents of IHCs were blocked by adding 20 μM of the dihydropyridine blocker nifedipine to the external solution (Sigma Aldrich, St Louis, USA; cat # N7634). To allow efficient diffusion and blocking of Ca<sup>2+</sup> currents by nifedipine, the

organs of Corti were always incubated for 5-10 minutes with the drug before starting to patch. Photo-inactivation of nifedipine was achieved by applying brief UV flashes from a UV LED light source (Mic-LED 365, 128 mW, Prizmatix, Givat Shmuel, Israel). The UV LED device was directly connected to the epi-illumination port at the rear of the upright Nikon FN1 microscope and illumination was focalized through the 60X objective (CFI Fluor 60X W NIR, WD = 2.0 mm, NA=1) and TTL triggered by the Patchmaster software.

### Caged $\text{Ca}^{2+}$ photolysis

To trigger a fast increase in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration from the caged  $\text{Ca}^{2+}$  chelator DM-nitrophen (Interchim; cat # FP-M1437A), we used the same UV LED light source as described above. Exocytosis was measured in hair cells loaded with (in mM): CsCl 145; HEPES 5; TEA 20; DM-nitrophen 10;  $\text{CaCl}_2$  10. In these conditions, the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was estimated to rise instantaneously to 80  $\mu\text{M}$  (Vincent *et al.*, 2014). In some experiments, the extracellular solution was complemented with 20  $\mu\text{M}$  nifedipine or 10  $\mu\text{M}$  of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel agonist BayK8644 (Tocris; cat # 1544) to block or enhance the  $\text{Ca}^{2+}$  current, respectively. This protocol allowed us to investigate the role of  $\text{Ca}^{2+}$  influx through L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels at resting potential (-70mV)

### $\text{Ca}^{2+}$ imaging

Calcium imaging was performed from P14-P17 IHCs expressing the genetically encoded fast  $\text{Ca}^{2+}$  indicator GCaMP6f (Chen *et al.*, 2013). These IHCs were obtained by injecting the cochlea of mice at post-natal age P3 *in vivo* with the adeno-associated virus AAV2/8 containing the encoding sequence of GCaMP6f. Whole-mounts of the apical region of the organs of Corti were dissected and mounted in the recording chamber as described above.

*Image acquisition:* As described by Vincent *et al.* (2014), changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  were measured continuously with a C2 confocal system and NIS-element imaging software (Nikon, Japan) coupled to the FN1 microscope. The dye was excited with a 488 nm solid-state laser (85-BCD-010-706, Melles Griot, CA USA) and 500-530 nm emission recorded at 18 images/s.

*Image analysis:* Fluorescence emission was measured with Image J software (W.S. Rasband, NIH, Bethesda, USA) by drawing a ROI (Region Of Interest) of 3.7  $\mu\text{m}^2$  (8 X 8 pixels) at the synaptic zones below the nucleus, in the region above the nucleus and below the cuticular plate region (apical region). Emission fluorescent signals were analyzed and normalized by the ratio  $F/F_{min}$  ratio, where  $F_{min}$  is the minimum fluorescence found before starting stimulation.

### Immunohistofluorescence

*Preparation of tissues:* The ramps of the cochlear apparatus of P14-P16 *Otof*<sup>+/-</sup> and *Otof*<sup>-/-</sup> mice were dissected and prepared as previously described by Vincent *et al.*, 2014. Briefly, they were rapidly perfused with 100% methanol at -20°C for 30 min and washed with cold phosphate buffered saline (PBS). The inner ear was then incubated for 2 hours in PBS solution containing 10% EDTA. The organ of Corti was then dissected and the tectorial membrane removed. Tissue was first incubated with PBS containing 30% normal horse serum for 1 hour at room temperature. Synaptic ribbons, Cav1.3 channels or vesicular transporter 3 (VGLUT3) and otoferlin were simultaneously labeled with anti-CtBP2 (Goat polyclonal, Santa Cruz, USA; cat # SC-5966), anti Cav1.3 (Rabbit polyclonal, Alomone labs, Jerusalem, Israel; cat # ACC-005) or anti-VGLUT3 (Rabbit polyclonal, Synaptic System, Germany; cat # 135 203) and anti-otoferlin (Mouse monoclonal, AbCam, Paris, France; cat # ab53233) antibodies, respectively. Actin-F was also used to visualize hair cells (1:100, Phalloidin Fluoprobe 405, Interchim, Montlucon, France; cat # FP-CA9870). We used secondary

antibodies at 1:500: first Donkey anti-Goat Fluoprobe 547H (Interchim; cat # FP-SB2110 and Donkey anti-Mouse Fluoprobe 647 (Interchim; cat # FP-SC4110) and then Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 488 after a PBS rinse (Invitrogen; cat # A-11008). The surface preparation of organs of Corti (apical turns) was then mounted on Superfrost-Plus glass slides (Kindler GmbH, Freiburg, Germany) in a Prolong-Antifade medium (Molecular Probes, Invitrogen, Oregon USA) and kept in the dark at -20°C until observation.

**Image Acquisition:** Samples were analyzed using a confocal laser scanning microscope Leica SP8 with a 63X oil immersion objective (NA=1.4) and white light laser (470 to 670 nm) (Bordeaux Imaging Center). Phalloidin was imaged by using a diode laser at 405 nm also mounted on the microscope. Stack images were acquired with the same parameters as in our previous study (Vincent *et al*, 2014)

## RT-PCR

**Isolation and precipitation of total RNA:** Apical turns of 4 organs of Corti from P35 *Otof*<sup>+/+</sup> or P35 *Otof*<sup>-/-</sup> mice were freshly dissected and stored in separate tubes containing 15 µl RNase inhibitor (Amresco, cat # E633) maintained in dry ice. Total RNA was extracted from tissues using the RNeasy protocol (Molecular Research Center, INC, Ohio, USA, cat # RN 190).

**Reverse transcription (RT):** mRNA (0.5 µg) was reverse transcribed to cDNA by using oligodT primers and AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase (Stratagene; cat # 600107). RT was performed at 37°C overnight.

**Polymerase Chain Reaction (PCR):** Specific PCR amplification was performed by using 0.45 µg cDNA and Herculase II Fusion DNA Polymerase (Stratagene, cat # 600677). Sense (s) and antisense (as) primers (Eurofins Genomics, Germany) are summarized in the following table.

**RT-PCR (pooled IHCs and OHCs):** Apical turns from P18 mice were placed in the same recording chamber as that used for patch-clamp recording. Using a large patch pipette ( $R \leq 1.5 \text{ M}\Omega$ ), we collected 6 to 10 IHCs and broke the tip of the patch-pipette in a low DNA binding tube resting on dry ice and containing 15 µl of RNase inhibitor. A similar protocol was used for OHCs. RT-PCR from IHCs or OHCs was performed as aforementioned for the whole organ of Corti.

Target		Designation	Primer sequences (5' -> 3')	Product size (pb)
Myosin VIIa		6375s	CACCTGATGACTGGAAAC	340
		6715as	ATCATCCATTTTGTATCCC	
Cav1.3 ( $\alpha_{1D}$ )	Exon 42-46	5010s	AGATGACGAGCCAGAAGACTCC	618
		5637as	GCTGCCTGGGTACCTGTTGTA	
	Exon 42	4664s	CAACCCTGTTTGCTTTGGTC	331
		4995as	TATAGCCCGTCGGATTTCTG	
	Exon 42A	4946s	ATGCTTGAACGGATGCTTTAG	200
		5146as	CTTCCTTCCGGAGGAGTGC	
	Exon 44	5425s		720
		5845as		
	$\Delta 44$	5010s	AGATGACGAGCCAGAAGACTCC	452
		5462as		

**Real-time semi-quantitative PCR (Q-PCR)**

We performed Q-PCR from 0.45 µg cDNAs obtained from apical turns of organ of Corti as described above. PCR amplification was stopped at cycles 30, 31, 32, 33, 34 and 36 and analyzed by plotting fluorescence intensity. Data points were fitted using a sigmoidal function. Intensity was normalized to noise level. We used the cycle threshold parameter (Ct) to compare the amplification of each isoform. Ct was determined by tracing a line at the lowest intensity corresponding to the exponential phase of the sigmoidal curve (i.e. between the start of the signal increase and the start of the linear phase of the sigmoidal curve). The Ct parameter was the intersection point between this line and the sigmoidal curve.

All PCR products obtained from organs of Corti and pooled hair cells were cloned and sequenced.

**Statistical analysis**

Electrophysiological results were analyzed with Patchmaster (HEKA Elektronik, Germany), OriginPRO 9.1 (OriginLab, Northampton, USA) and IgorPro 6.3 (Wavemetrics, Oregon, USA). Results are expressed as mean ± SEM. Statistical analyses were performed by using Student's t-test. The limit of significance was set at 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS

### A nifedipine-resistant, fast-inactivating, Ca<sup>2+</sup> current

The addition of 20  $\mu\text{M}$  nifedipine to the extracellular medium reduced the Ca<sup>2+</sup> current amplitude in IHCs by nearly 75 % from a mean peak value of  $-184 \pm 19$  pA in the absence of nifedipine (control condition, black) to a mean value of  $-46 \pm 5$  pA at  $-10$  mV (nifedipine, green;  $p < 0.05$ ; **Fig. 1A**). The nifedipine-resistant current (**Fig. 1A, inset**) showed a similar voltage-dependence as compared to the total current in the control condition. Indeed, when fitting the IV curves from  $-70$  mV to  $-10$  mV with a sigmoidal Boltzmann function, there was no significant difference either in the half-maximum voltage activation ( $V_{1/2}$ ;  $27.9 \pm 0.9$  mV and  $26.9 \pm 0.8$  mV, nifedipine and control condition, respectively;  $p = 0.45$ ) or in the slope factor (K;  $5.9 \pm 0.4$  pA/mV and  $5.7 \pm 0.2$  pA/mV, nifedipine and control condition, respectively;  $p = 0.69$ ).

UV-flash photolysis instantaneously inactivated nifedipine and unblocked Ca<sup>2+</sup> channels leading to Ca<sup>2+</sup> current with a mean time constant of  $8.4 \pm 0.7$  ms (**supplementary Fig. 1 and Fig. 1**). The reactivated Ca<sup>2+</sup> current showed a nearly 2.5-fold increase in amplitude from its blocked state, rising from a peak value of  $-46 \pm 5$  pA in the presence of nifedipine to  $-108 \pm 10$  pA after the UV flash ( $p < 0.05$ ; **Fig. 1A**, purple trace). Comparison of the voltage-dependent parameters of the Ca<sup>2+</sup> current before and after UV flash photolysis of nifedipine showed no significant changes either in  $V_{1/2}$  ( $27.9 \pm 0.9$  mV and  $28.5 \pm 1.5$  mV, respectively,  $p = 0.73$ ) or in the Boltzmann slope ( $5.96 \pm 0.41$  pA/mV and  $6.29 \pm 0.23$  pA/mV, respectively;  $p = 0.42$ ; **Fig. 1A, inset**). The maximum reactivated Ca<sup>2+</sup> currents reached nearly 60 % of control values in the absence of nifedipine. Control condition Ca<sup>2+</sup> currents evoked during a 100 ms voltage step from  $-80$  mV to  $-10$  mV displayed a partial fast inactivation, corresponding to a reduction of  $17.6 \pm 2.2$  % of initial current at the end of the pulse (**Fig. 1C**, first pulse). In the presence of nifedipine, Ca<sup>2+</sup> currents showed a similar fast inactivation with an amplitude corresponding to  $54.6 \pm 3.7$  % of the initial current (**Fig. 1D**; first pulse). The kinetics and amplitude of the fast-inactivating component of the Ca<sup>2+</sup> current in both control and nifedipine conditions were obtained by subtracting current values between two consecutive 100 ms pulses (P1-P2) separated by 100 ms (**Fig. 1F**). The fast-inactivating components in control and nifedipine conditions had a maximum amplitude of  $40 \pm 8$  pA and  $20 \pm 3$  pA, respectively; ( $p < 0.05$ ). They showed similar fast-inactivating kinetics with a time constant of  $3.8 \pm 1.3$  ms and  $4.6 \pm 0.9$  ms in control and nifedipine conditions, respectively ( $p = 0.57$ ). A similar fast-inactivating component of Ca<sup>2+</sup> currents was previously described in rat IHCs (Grant and Fuchs, 2008) and frog hair cells (Schnee and Ricci, 2003). Our results show that the fast-inactivating component of IHCs Ca<sup>2+</sup> currents was only weakly affected by nifedipine. Considering a unitary current of 0.5 pA and a mean number of 20 ribbons per IHC (Vincent *et al.*, 2014), we estimated that this transient nifedipine-resistant Ca<sup>2+</sup> current is conducted by a total of 80 channels per IHC, corresponding to about 4 channels per ribbon.

### A reduced fast-inactivating Ca<sup>2+</sup> current in IHCs lacking otoferlin

Fast inactivation of Ca<sup>2+</sup> current was then investigated in IHCs from otoferlin-deficient mice (*Otof*<sup>-/-</sup>). Otoferlin is the major Ca<sup>2+</sup> sensor of the IHC and is thought to interact with the Cav1.3 II-III loop (Ramakrishnan *et al.*, 2009). As previously described (Roux *et al.*, 2006), we found that *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs displayed Ca<sup>2+</sup> current amplitudes similar to *WT* ( $-164 \pm 7$  pA,  $n = 9$  and  $-184 \pm 19$  pA,  $n = 8$ , respectively;  $p = 0.33$ ; **Fig. 1B**). The sigmoidal Boltzmann fit of the IV curve did not display any significant differences either in  $V_{1/2}$  ( $27.0 \pm 0.7$  mV and  $26.9 \pm 0.8$  mV, *Otof*<sup>-/-</sup> and *WT*, respectively;  $p = 0.93$ ) or in the slope factor K ( $6.3 \pm 0.3$  pA/mV and  $5.7 \pm 0.2$  pA/mV and, *Otof*<sup>-/-</sup> and *WT*, respectively;  $p = 0.1$ ; **Fig. 1B, inset**). However, Ca<sup>2+</sup> currents of *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs displayed a largely reduced fast-inactivating component (**Fig. 1E**,

**1G**). Indeed, a 100 ms paired-pulse voltage-step protocol (P1-P2) led to a 62 % reduction in the fast-inactivating component in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs as compared to *WT* ( $15.0 \pm 2.2$  pA and  $40 \pm 8$  pA, respectively,  $p < 0.05$ ; **Fig. 1E, 1G**). The residual inactivating component in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs had similar kinetics than that of *WT* ( $4.1 \pm 0.9$  ms and  $3.8 \pm 1.3$  ms, respectively,  $p = 0.85$ ; **Fig. 1E, 1G**). These results indicated a reduced expression of fast-inactivating  $\text{Ca}^{2+}$  channels in IHCs lacking otoferlin.

### **Nifedipine-resistant $\text{Ca}^{2+}$ currents trigger efficient fast RRP exocytosis**

Although showing a large reduction in  $\text{Ca}^{2+}$  current, IHCs displayed exocytotic amplitudes similar to the control condition ( $20.15 \pm 4.64$  fF and  $23.16 \pm 2.53$  fF, respectively,  $p = 0.64$ ; **Fig. 2A, 2B, 2D**) when tested by two repetitive 100-ms voltage steps from -80 to -10 mV in the presence of nifedipine. However, exocytosis in nifedipine-treated IHCs displayed larger paired-pulse depression as compared to the control condition ( $75 \pm 5$  % and  $32 \pm 16$  %, respectively;  $p < 0.05$ ; **Fig. 2A, 2D, 2E**). Increasing the concentration of intracellular EGTA from 1 to 5 mM in the presence of nifedipine only slightly reduced the first exocytotic response to  $13.5 \pm 1.9$  fF (**Fig. 2C, 2D**, blue,  $p < 0.05$ ). In the latter conditions, the paired-pulse protocol also showed large depression. Notably, *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs also showed a first exocytotic response reduced to  $10.58 \pm 2.34$  fF ( $p < 0.05$ ) and a 77% paired-pulse depression (**Fig. 2D, 2E**).

We then compared the  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency of exocytosis obtained with a 100 ms step depolarization from -80 mV to +5 mV in the presence of nifedipine (green) and after nifedipine-UV inactivation in the same *WT*-IHCs (purple; **Fig. 2F, 2G**). Remarkably, exocytosis showed a twofold higher  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency in the presence of nifedipine as compared to responses obtained after UV unblocking  $\text{Ca}^{2+}$  channels ( $0.25 \pm 0.01$  fF/pA and  $0.16 \pm 0.01$  fF/pA, before and after UV flash respectively,  $p < 0.05$ ). These results suggested that the IHC RRP release essentially depends on nifedipine-resistant  $\text{Ca}^{2+}$  currents.

### **RRP exocytosis triggers transient block ( $I_{\text{CaTB}}$ ) of nifedipine-resistant $\text{Ca}^{2+}$ currents**

When IHCs were incubated in 20  $\mu\text{M}$  extracellular nifedipine,  $I_{\text{CaTB}}$  amplitude and kinetics were not affected (**Fig. 3**). In control condition (without nifedipine)  $\text{Ca}^{2+}$  current displays a notch or a fast transient block ( $I_{\text{CaTB}}$ ) right after their peak onset (**Fig. 3A**, black traces), with a kinetic of  $2.3 \pm 0.2$  ms and an amplitude of  $29.6 \pm 2.4$  pA corresponding to  $15.1 \pm 1.43$  % of the total  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $n = 17$ , **Fig. 3B**). As in Fig 2B-2D, in the presence of nifedipine, while the  $\text{Ca}^{2+}$  current was reduced by more than 50 % ( $94.6 \pm 8.1$  pA and  $190.2 \pm 5.6$  pA, nifedipine and control, respectively;  $p < 0.05$ ), IHCs displayed exocytotic amplitudes similar to the controls ( $36.6 \pm 5.9$  fF and  $31.9 \pm 1.9$  fF, respectively;  $p = 0.32$ , **Fig. 3A and Fig. 3B**). Interestingly, nifedipine-resistant  $\text{Ca}^{2+}$  currents displayed a  $I_{\text{CaTB}}$  comparable to controls:  $I_{\text{CaTB}}$  amplitudes with nifedipine averaged  $26.0 \pm 2.3$  pA ( $n = 8$ ;  $p = 0.49$ ) and their kinetics was  $1.9 \pm 0.4$  ms ( $p = 0.38$ ). To analyze the correlation between the proton effect and the amplitude of the exocytotic response, we applied a train of 100 ms step depolarization from -80 to -10 ms, each step spacing by 100 ms (**Fig. 3C**, top). In IHCs incubated with 20  $\mu\text{M}$  nifedipine,  $I_{\text{CaTB}}$  and exocytosis displayed a linear relationship similar to control conditions ( $p = 0.18$ ; **Fig. 3D**). These results suggest that the proton block of the  $\text{Ca}^{2+}$  current essentially depend on the fusion of the RRP and that the  $\text{Ca}^{2+}$  channels involved are nifedipine-resistant.

### **Nifedipine severely impairs the sustained exocytotic component of the IHCs**

A protocol of vesicle recruitment was tested by applying a train of 100 ms step depolarization from -80 mV to -10 mV with a 100 ms time interval in control and nifedipine-treated *WT*-IHCs (**Fig. 4A-3C**). To unblock  $\text{Ca}^{2+}$  channels, a UV flash was applied during the



train of stimulation. In control *WT*-IHCs, exocytosis first showed a slight depression after the second pulse and then a sustained linear increase that was not affected by the UV flash (**Fig. 4A, 3C**, black lines). In nifedipine-treated *WT*-IHCs, exocytosis displayed a strong depression after the second pulse and the exocytotic response was restored only after a long latency ranging from 700 to 800 ms after the UV flash, although the  $\text{Ca}^{2+}$  current was instantaneously unblocked (**Fig. 4B, 3C**; green lines). In *WT*-IHCs loaded with 5 mM intracellular EGTA in the presence of nifedipine, exocytosis showed a constant depression with no recovery after UV-unblocking  $\text{Ca}^{2+}$  current (**Fig. 4C**, blue line). Similar sustained depression was observed in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (**Fig. 4D**, red line).

### Imaging $\text{Ca}^{2+}$ influx from nifedipine-resistant $\text{Ca}^{2+}$ channels

Simultaneous  $\text{Ca}^{2+}$  imaging and whole-cell patch clamp recordings were performed in *WT*-IHCs expressing the genetically encoded fast  $\text{Ca}^{2+}$  indicator GCaMP6f (Chen *et al.*, 2013). These experiments were performed in the presence or in absence of 20  $\mu\text{M}$  nifedipine during a train of 100 ms step depolarization (**Fig. 5**). In control conditions, the recruitment protocol led to a parallel increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (**Fig. 5C**) and membrane capacitance (**Fig. 5A**). Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  instantaneously increased at the synaptic zones in two phases (**Fig. 5C**): a first phase (Ph.1) that mirrored the fast-inactivating  $\text{Ca}^{2+}$  currents and a second slow component (Ph.2) that corresponded to the sustained  $\text{Ca}^{2+}$  currents (**Fig. 5E, 5G**). A rise in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  was also recorded at extrasynaptic sites around and above the nucleus but with a long delay of several hundred ms and a much smaller amplitude as compared to that of the synaptic zones (**Fig. 5C, 5G, 5H'**). These results suggested a diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  from the synaptic zones where  $\text{Ca}^{2+}$  channels are concentrated (**Fig. 5C**). Remarkably, the  $\text{Ca}^{2+}$  rise in this supra-nuclear region (orange trace in **Fig. 5C**) perfectly mirrored the sigmoidal increase in cumulative exocytosis during the train protocol. This indicated that a deep intracellular diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  is required for an efficient vesicular recruitment.

Remarkably, transient fast  $\text{Ca}^{2+}$  responses were also recorded at the sub-cuticular zone of IHCs (**Fig. 6A-6C**). These  $\text{Ca}^{2+}$  responses peaked with no apparent delay with the  $\text{Ca}^{2+}$  synaptic responses although positioned at more than 20  $\mu\text{m}$  away from the synaptic zones, indicating that they were not due to  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion. Although most of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels are clustered at the basal synaptic ribbons (**Fig. 5D**), our results suggested that some  $\text{Ca}^{2+}$  channels are also located at extra-synaptic zones below the sub-cuticular area. The immuno-detection of Cav1.3 channels in the sub-cuticular zone of IHCs strongly reinforced this hypothesis (**Fig. 5D**). On the contrary to the sub-cuticular zones, the  $\text{Ca}^{2+}$  responses measured near the middle of the cell above the nucleus, at about 9  $\mu\text{m}$  away from the synaptic base, showed a large delay in its peak of  $190.6 \pm 18.6$  ms ( $n = 7$ ) as compared the synaptic area. These  $\text{Ca}^{2+}$  responses above the nucleus were likely due to  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion from the synaptic zones and the sub-cuticular area.

In nifedipine condition, at the synaptic zones,  $\text{Ca}^{2+}$  responses of Ph. 1 showed similar kinetics as compared to the control condition ( $4.57 \pm 0.9$   $\Delta\text{F}/\text{s}$  and  $4.75 \pm 1.2$   $\Delta\text{F}/\text{s}$ , respectively;  $p = 0.9$ ) but Ph. 2 was largely diminished (**Fig. 6D, 6F, 6H**). At the supra-nuclear zone of the cells, the  $\text{Ca}^{2+}$  responses were completely suppressed by nifedipine (**Fig. 6D, 6F, 6H'**). These results suggested that most of the fast-inactivating nifedipine-resistant  $\text{Ca}^{2+}$  channels are located at the basal synaptic active zones. UV photolysis of nifedipine instantaneously increased the  $\text{Ca}^{2+}$  current amplitude (**Fig. 6B**) and  $\text{Ca}^{2+}$  signals (Ph. 3; **Fig. 6D, 6H**). However, the recovery of the exocytotic response displayed a large latency of several hundred ms after the UV flash. Since nifedipine is not likely to reach and affect the intracellular exocytotic machinery as indicated by the conserved first exocytotic jump (**Fig. 3A, 3B, 3D**), our results suggest that the delay in vesicular recruitment is due to a large depletion of vesicles at the sites of release when  $\text{Ca}^{2+}$  channels are blocked with nifedipine.

## Intracellular Ca<sup>2+</sup> uncaging reveals a largely depressed RRP exocytosis in nifedipine-treated IHCs

The uncaging protocol used in the present study instantaneously increased the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration to about 80  $\mu$ M (Vincent *et al.*, 2014). Under such stimulation, the exocytotic response could typically be described by a sigmoidal curve, displaying a first slow rise (called loading step or LS) followed by a steep acceleration and finally a slowdown before a plateau (**Fig. 7A, 6B**). The LS rate was measured for each *WT*-IHC by fitting the first part of the sigmoidal curve with a linear function. The LS amplitude corresponded to the inflection point between the slow and the steep part of the sigmoidal curve. The latency of the response was measured between the start of the flash and the first significant rise in capacitance. Uncaging Ca<sup>2+</sup> in the presence of nifedipine significantly slowed down the kinetics of the exocytotic response, largely decreased its maximum amplitude, and increased the LS latency as compared to control *WT*-IHCs (**Fig. 7A, 7B; Table 1**). Also, in the presence of nifedipine, the LS response was preceded by a transient decrease in membrane capacitance that likely corresponded to vesicle endocytosis (**Fig. 7A, 7B**). On the contrary, pre-incubating *WT*-IHCs with BayK8644, a Ca<sup>2+</sup> channel agonist that increases channel open probability (Brown *et al.*, 1984; Brandt *et al.*, 2005), shortened LS latency (**Fig. 7C, 7D; Table 1**). However, the rate of LS was reduced. This reduction in latency and rate was also observed when uncaging Ca<sup>2+</sup> in *WT*-IHCs held at -30 mV (Vincent *et al.*, 2014). These results suggest that the resting activity of Ca<sup>2+</sup> channels intrinsically regulates the size and distance of the vesicle pool from the site of release. Our results are in good agreement with the study by Schnee and collaborators (2011) showing that the onset of the superlinear release component in turtle auditory hair cells is highly dependent on Ca<sup>2+</sup> entry.

## Expression of short and long Cav1.3 channel isoforms in IHCs

Transcripts of the Cav1.3 long isoform (Cav1.3<sub>42L</sub>) were detected in mature organs of Corti of P20-P35 mice (**Fig. 8A, 8B**). Two short alternative splicing isoforms 43S (Cav1.3<sub>43S</sub>) and 42A (Cav1.3<sub>42A</sub>) were also identified. RT-PCR of transcripts directly collected from P18 *WT*-IHCs with a patch pipette also showed the expression of these long and short isoforms of Cav1.3 at the cellular level (**Fig. 8E**). Quantitative PCR showed that *Otof*<sup>-/-</sup> organs of Corti had a reduced expression of Cav1.3<sub>43S</sub> and Cav1.3<sub>42A</sub> short isoforms at P20 and P35 as compared to *WT* (**Fig. 8A, 8C, 8D**) while the long isoform Cav1.3<sub>42L</sub> did not show any significant change (not shown). Along with the reduced inactivation of Ca<sup>2+</sup> current in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (**Fig. 1G**), these results suggest that Cav1.3<sub>43S</sub> and Cav1.3<sub>42A</sub> likely underlie the fast-inactivating and nifedipine-resistant currents described in *WT*-IHCs (**Fig. 1F**).

Notably, mature *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs displayed a nearly twofold decrease in the number of ribbons per IHCs ( $19 \pm 1$  ribbons per cell and  $9 \pm 2$  ribbons in P16-*Otof*<sup>+/-</sup> and P16-*Otof*<sup>-/-</sup> IHC, respectively;  $p < 0.05$ ; **Fig. 8F, 8G**). The mean surface area of the ribbons was also decreased in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (**Fig. 8H**;  $4.6 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$  and  $3.3 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$ , *Otof*<sup>+/-</sup> and *Otof*<sup>-/-</sup>;  $p < 0.05$ ). Taken together, these results suggest that otoferlin is required for both the expression of the short Cav1.3 isoforms and the organization of normal ribbons in IHCs.

## DISCUSSION

### IHCs use Cav1.3 long and short isoforms to finely control exocytosis

Our results show that post-hearing IHCs express a fast-inactivating nifedipine-resistant  $\text{Ca}^{2+}$  current that represents 25 % of the total  $\text{Ca}^{2+}$  current. The half-maximum voltage-activation of this current was established at  $\sim -28$  mV excluding therefore the implication of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels that are characterized by a higher negative activation range (see Carbone *et al.*, 2014). Furthermore, T-type channels are believed to be expressed only in pre-hearing immature hair cells (Levic *et al.*, 2007; Levic and Dulon, 2012). A transient proton-mediated block of  $\text{Ca}^{2+}$  channels has been described during exocytosis in auditory bullfrog hair cells (Cho and von Gersdorff, 2014). However, this is unlikely to be the case in our study since we were working with 10 mM extracellular HEPES buffer, a concentration which prevents pH variations at the IHC synaptic cleft (Cho and von Gersdorff, 2014). We think, however, that the fast-inactivating nifedipine-resistant  $\text{Ca}^{2+}$  current uncovered in our study is essentially conducted by unblocked Cav1.3 channels. This hypothesis is reinforced by the fact that *Cav1.3*<sup>-/-</sup> IHCs display less than 10 % of WT  $\text{Ca}^{2+}$  current and that this residual current does not show inactivation (Platzer *et al.*, 2000; Brandt *et al.*, 2003 see their Fig.3F and Fig.1A, respectively). Our results also suggest that the fast-inactivating nifedipine-resistant  $\text{Ca}^{2+}$  currents are driven by the Cav1.3 short isoforms 42A and 43S, whose transcripts were found to be strongly expressed in IHCs. Notably, expression in a heterologous system of these short Cav1.3 isoforms display  $\text{Ca}^{2+}$  currents with similar fast inactivation and reduced sensitivity to nifedipine (Singh *et al.*, 2008; Bock *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013). This hypothesis is further reinforced by the decrease of the fast-inactivating component of the  $\text{Ca}^{2+}$  current paralleled a reduced expression transcript of Cav1.3<sub>42A</sub> and Cav1.3<sub>43S</sub> in IHCs lacking otoferlin.

Remarkably, we found that the nifedipine-resistant  $\text{Ca}^{2+}$  current could still trigger a very efficient RRP exocytotic response when a short depolarizing pulse was applied. However, this exocytotic response showed a large depression during a paired-pulse or a train protocol. These results suggest that the fast-inactivating nifedipine-resistant  $\text{Ca}^{2+}$  channels are mainly involved in the release of RRP composed of ribbon associated vesicles, whereas the nifedipine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels allowing deep intracellular diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  mainly control vesicular recruitment (SRP)

### The carboxy-terminal domain of Cav1.3 channels shapes the inactivation kinetics

The carboxy-terminal (c-term) region of the Cav1.3 subunit contains regulatory domains that control calcium-dependent inactivation (CDI). This process occurs when the four EF-hand  $\text{Ca}^{2+}$  sensing protein calmodulin (CaM) interacts with the IQ and pre-IQ domains (Peterson *et al.*, 1999; Qin *et al.*, 1999; Catterall, 2011; Erikson *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2010; Striessnig *et al.*, 2014). Calmodulin-like calcium-binding proteins (CaPBs), which have been found expressed in chick (Lee *et al.*, 2007) and mice hair cells (Cui *et al.*, 2007), can also regulate the CDI kinetics by competing with CaM interaction at the IQ domain (Lee *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2007; Striessnig *et al.*, 2014). Multiple CaPBs isoforms are expressed in IHCs, notably CaPB1 and CaPB2 which are well colocalized at the IHC ribbon synapse (Cui *et al.*, 2007). In addition, at the extreme C-terminus of Cav1.3 long isoforms, two alpha helix proximal (PCRD) and distal carboxy-terminal regulatory domains (DCRD, see **Fig. 7B**) interact with each other to form the C-terminal regulatory domain (CTM). This CTM domain is thought to slow down the inactivation kinetics of long Cav1.3 isoforms by competing with the interaction of the  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM and IQ domains (Singh *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010, Striessnig *et al.*, 2014). Although the short isoforms Cav1.3<sub>42A</sub> and Cav1.3<sub>43S</sub> lack the two last domains PCRD and DCRD or only the DCRD domain, respectively, they still express the pre-

IQ and IQ domains for  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM regulation (Huang *et al.*, 2013). These truncated C-term regulatory domains in Cav1.3<sub>42A</sub> and Cav1.3<sub>43S</sub> channels is likely to explain their peculiar fast-inactivating kinetics in the ms range (Singh *et al.*, 2008; Bock *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013). The fact that the nifedipine-resistant  $\text{Ca}^{2+}$  current we observed in IHCs displays similar fast inactivation kinetics in the ms range again reinforces the hypothesis that it is mostly driven by Cav1.3<sub>42A</sub> and Cav1.3<sub>43S</sub> isoforms. Notably, the total  $\text{Ca}^{2+}$  current in IHCs displayed a small fast-inactivating component (with  $t \sim 8\text{ms}$ ) and a second large slowly inactivating component (with  $\tau \sim 65\text{ms}$ ; data not shown), in agreement with results obtained in turtle auditory hair cells (Schnee and Ricci, 2003). This second slow-inactivating component which is sensitive to nifedipine likely corresponds to the slow inactivation of the Cav1.3<sub>42L</sub> long isoform (bearing 75% of total  $\text{Ca}^{2+}$  current) that conserves intact PCRD and DCRD domains (**Fig. 7B**).

### Expression of Cav1.3<sub>42A</sub> and Cav1.3<sub>43S</sub> isoforms requires otoferlin

In *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs, we found that expression of Cav1.3<sub>42A</sub> and Cav1.3<sub>43S</sub> transcripts is decreased and associated with a large reduction in the amplitude of fast-inactivating  $\text{Ca}^{2+}$  currents. Similarly,  $\text{Ca}^{2+}$  currents in immature P2-P3 *Otof*<sup>-/-</sup> outer hair cells (OHCs) were found to lack the fast-inactivating component (Beurg *et al.*, 2008; see their **Fig. 3A**). In addition, we performed RT-PCR experiments from apical P18 pooled OHCs that showed not only the expression of Cav1.3 long isoform transcripts as previously shown by Knirsch *et al.* (2007) but also the expression of Cav1.3<sub>42A</sub> transcripts. Cav1.3<sub>43S</sub> transcripts were, however not detected in OHCs (data not shown).

As previously shown by Roux *et al.* (2006), we found a 50 % decrease in the number of synaptic ribbons in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs. Otoferlin thus appears essential not only for sensing  $\text{Ca}^{2+}$  and preserving ribbons at the presynaptic active zones but also for maintaining a strong mRNA expression of the Cav1.3<sub>42A</sub> and Cav1.3<sub>43S</sub> channels. Disruption of the ribbon-associated cytomatrix protein bassoon in IHCs has also been shown to generate a loss of synaptic ribbons and a concomitant reduction in Cav1.3 channel expression (Frank *et al.*, 2010). The reduction in the number of ribbons and the concomitant decrease in  $\text{Ca}^{2+}$  current inactivation observed in our study suggest that Cav1.3<sub>42A</sub> and Cav1.3<sub>43S</sub> channels are functionally associated with the synaptic ribbons in IHCs.

### The gain of using various Cav1.3 isoforms during IHC exocytosis

Auditory IHCs are remarkable in that they precisely encode sound timing information up to several kHz into phase-locked specific afferent discharge rates (Palmer and Russel, 1986). Pre-synaptic Cav1.3 short isoforms inactivating in the ms range would certainly be crucial for ensuring high frequency phase-locking and rapid adaptation of the afferent discharge rate. In central neurons (Tan *et al.*, 2011) and in heart pacemaker cells (Bock *et al.*, 2011), short Cav1.3 isoforms are believed to limit  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation during fast bursting activity. In IHCs, these short isoforms might help to reduce the size of  $\text{Ca}^{2+}$  domains below the synaptic ribbons. Notably, the ribbons themselves with their docked vesicles placed near the  $\text{Ca}^{2+}$  channels (Vincent *et al.*, 2014) could further limit intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion by acting as a diffusion barrier (Graydon *et al.*, 2011). Conversely, slowly inactivating long Cav1.3 isoforms might allow a sustained and deeper  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion in IHCs (Liu *et al.*, 2010), an essential property for recruiting deep vesicles placed far from the release sites. The essential role of Cav1.3 long isoforms in the process of vesicle recruitment and replenishment of the sites of release is further reinforced by our  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging experiments.

**Extrasynaptic Ca<sup>2+</sup> channels at the sub-cuticular zone of IHCs**

In our study, Ca<sup>2+</sup> imaging during repetitive stimulations showed a large diffusion of Ca<sup>2+</sup> from the synaptic active zones toward the supra-nuclear region of IHCs, suggesting that this extrasynaptic diffusion of Ca<sup>2+</sup> is involved in the recruitment of vesicles far from the ribbons. Furthermore, both Ca<sup>2+</sup> imaging and immunohistochemistry experiments suggested the expression of few extrasynaptic Cav1.3 channels located below the cuticular plate, where BK channels (Pyott *et al.*, 2004; Hafidi *et al.*, 2005) and ryanodine receptors (Beurg *et al.*, 2005) have been previously shown to be strongly expressed. These apical extrasynaptic Ca<sup>2+</sup> channels could also evoke calcium-induced calcium release (Beurg *et al.*, 2005; Castellano-Muñoz and Ricci, 2014) and regulate BK currents (Skinner *et al.*, 2003; Beurg *et al.*, 2005). They could regulate Ca<sup>2+</sup>-dependent exo-endocytotic processes at the hair cell cuticular plate as previously suggested in the zebrafish's lateral line (Seiler and Nicholson, 1999) and in vestibular hair cells of the bull frog (Kachar *et al.*, 1997).

**REFERENCES**

- Beurg M, Michalski N, Safieddine S, Bouleau Y, Schneggenburger R, Chapman ER, Petit C, Dulon D (2010) Control of Exocytosis by Synaptotagmins and Otoferlin in Auditory Hair Cells. *J Neurosci* 30:13281-13290.
- Beurg M, Safieddine S, Roux I, Bouleau Y, Petit C, Dulon D (2008) Calcium- and otoferlin-dependent exocytosis by immature outer hair cells. *J Neurosci* 28: 1798-1803.
- Beurg M, Hafidi A, Skinner LJ, Ruel J, Nouvian R, Henaff M, Puel JL, Aran JM, Dulon D. (2005) Ryanodine receptors and BK channels act as a presynaptic depressor of neurotransmission in cochlear inner hair cells. *Eur J Neurosci* 22: 1109-1119.
- Brown AM, Kunze DL, Yatani A (1984) The agonist effect of dihydropyridines on Ca-channels. *Nature* 311:570-572.
- Bock G, Gebhart M, Scharinger A, Jangsangthong W, Busquet P, Poggiani C, Sartori S, Mangoni ME, Sinnegger-Brauns MJ, Herzig S, Striessnig J, Koschak A (2011) Functional properties of a newly identified C-terminal splice variant of Cav1.3 L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 286, 42736-42748.
- Brandt A, Khimich D, Moser T (2005) Few Ca(V)1.3 channels regulate the exocytosis of a synaptic vesicle at the hair cell ribbon synapse. *J Neurosci* 25:11577-11585.
- Brandt A, Striessnig J, Moser T (2003) Ca(V)1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 23:10832-10840.
- Carbone E, Calorio C, Vandael DH (2014) T-type channel-mediated neurotransmitter release. *Pflugers Arch* 466: 677-687.
- Castellano-Munoz M, Ricci AJ (2014) Role of intracellular calcium stores in hair-cell ribbon synapse. *Front Cell Neurosci* 8: 162.
- Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a003947.
- Chen TW, Wardill TJ., Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499: 295-300.
- Cho S, von Gersdorff H. Proton-mediated block of Ca<sup>2+</sup> channels during multivesicular release regulates short-term plasticity at an auditory hair cell synapse (2014) *J Neurosci* 34(48):15877-87.
- Cui G, Meyer AC, Calin-Jageman I, Neef J, Haeseleer F, Moser T, Lee A (2007) Ca<sup>2+</sup>-binding proteins tune Ca<sup>2+</sup>-feedback to Cav1.3 channels in mouse auditory hair cells. *J Physiol* 585: 791-803.
- Erickson MG, Liang H, Mori MX, Yue DT (2003) FRET two-hybrid mapping reveals function and location of L-type Ca<sup>2+</sup> channel CaM preassociation. *Neuron* 39: 97-107.

- Feldmeyer D, Zöllner P, Pohl B, Melzer W (1995) Calcium current reactivation after flash photolysis of nifedipine in skeletal muscle fibres of the frog. *J Physiol* 487: 51-6.
- Frank T, Rutherford MA, Strenzke N, Neef A, Pangrsic T, Khimich D, Fejtova A, Gundelfinger ED, Liberman MC, Harke B, Bryan KE, Lee A, Egner A, Riedel D, Moser T (2010) Bassoon and the synaptic ribbon organize Ca<sup>2+</sup> channels and vesicles to add release sites and promote refilling. *Neuron* 68: 724-738.
- Frank T, Khimich D, Neef A, Moser T (2009) Mechanisms contributing to synaptic Ca<sup>2+</sup> signals and their heterogeneity in hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:4483-4488.
- Grant L, Fuchs P (2008) Calcium- and calmodulin-dependent inactivation of calcium channels in inner hair cells of the rat cochlea. *J Neurophysiol* 99: 2183-2193.
- Graydon CW, Cho S, Li GL, Kachar B, von Gersdorff H (2011) Sharp Ca<sup>2+</sup> nanodomains beneath the ribbon promote highly synchronous multivesicular release at hair cell synapses. *J Neurosci* 31:16637-16650.
- Hafidi A, Beurg M, Dulon D (2005) Localization and developmental expression of BK channels in mammalian cochlear hair cells. *Neuroscience* 130: 475-484.
- Huang H, Yu D, Soong TW (2013) C-terminal alternative splicing of CaV1.3 channels distinctively modulates their dihydropyridine sensitivity. *Mol Pharmacol* 84: 643-653.
- Johnson SL, Marcotti W, Kros CJ (2005) Increase in efficiency and reduction in Ca<sup>2+</sup> dependence of exocytosis during development of mouse inner hair cells. *J Physiol* 563:177-191.
- Kachar B, Battaglia A, Fex J (1997) Compartmentalized vesicular traffic around the hair cell cuticular plate. *Hear Res* 107: 102-112.
- Kiang NY (1965) Discharge patterns of single fibers in the cat's auditory nerve. Cambridge, Ma: MIT press.
- Knirsch M, Brandt N, Braig C, Kuhn S, Hirt B, Munkner S, Knipper M, Engel J (2007) Persistence of Ca(v)1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in mature outer hair cells supports outer hair cell afferent signaling. *J Neurosci* 27: 6442-6451.
- Lee A, Westenbroek RE, Haeseleer F, Palczewski K, Scheuer T, Catterall WA (2000) Differential modulation of Ca(v)2.1 channels by calmodulin and Ca<sup>2+</sup>-binding protein 1. *Nat Neurosci* 5: 210-217.
- Lee S, Briklin O, Hiel H, Fuchs P (2007) Calcium-dependent inactivation of calcium channels in cochlear hair cells of the chicken. *J Physiol* 583: 909-922.
- Levic S, Nie L, Tuteja D, Harvey M, Sokolowski BH, Yamoah EN (2007) Development and regeneration of hair cells share common functional features. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19108-19113.



- Levic S, Bouleau Y, Dulon D (2011) Developmental Acquisition of a Rapid Calcium-Regulated Vesicle Supply Allows Sustained High Rates of Exocytosis in Auditory Hair Cells. *Plos One* 6.
- Levic S, Dulon D (2012) The temporal characteristics of Ca<sup>2+</sup> entry through L-type and T-type Ca<sup>2+</sup> channels shape exocytosis efficiency in chick auditory hair cells during development. *J Neurophysiol* 108: 3116-3123.
- Liu X, Yang PS, Yang W, Yue DT (2010) Enzyme-inhibitor-like tuning of Ca(2+) channel connectivity with calmodulin. *Nature* 463: 968-972.
- Mangoni ME, Couette B, Marger L, Bourinet E, Striessnig J, Nargeot J (2005). Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: from ionic currents to genes. *Prog Biophys Mol Biol* 90: 38-63.
- Morad M, Goldman YE, Trentham DR (1983) Rapid photochemical inactivation of Ca<sup>2+</sup>-antagonists shows that Ca<sup>2+</sup> entry directly activates contraction in frog heart. *Nature* 304: 635-8.
- Moser T, Beutner D (2000) Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 883-888.
- Palmer AR, Russell IJ (1986) Phase-locking in the cochlear nerve of the guinea-pig and its relation to the receptor potential of inner hair-cells. *Hearing Res* 24:1-15.
- 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-U116.
- Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT (1999) Calmodulin is the Ca<sup>2+</sup> sensor for Ca<sup>2+</sup> -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22: 549-558.
- Platzer, 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 Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell* 102: 89-97.
- Pyott SJ, Glowatzki E, Trimmer JS, Aldrich RW (2004) Extrasynaptic localization of inactivating calcium-activated potassium channels in mouse inner hair cells. *J Neurosci* 24: 9469-9474.
- Qin N, Olcese R, Bransby M, Lin T, Birnbaumer L (1999) Ca<sup>2+</sup>-induced inhibition of the cardiac Ca<sup>2+</sup> channel depends on calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2435-2438.
- Ramakrishnan NA, Drescher MJ, Drescher DG (2009) Direct interaction of otoferlin with syntaxin 1A, SNAP-25, and the L-type voltage-gated calcium channel Cav1.3. *J Biol Chem* 284: 1364-1372.

- 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.
- Sanguinetti MC, Kass RS (1984) Photoalteration of calcium channel blockade in the cardiac Purkinje fiber. *Biophys J* 45: 873-880.
- Schnee ME, Santos-Sacchi J, Castellano-Munoz M, Kong JH, Ricci AJ (2011) Calcium-Dependent Synaptic Vesicle Trafficking Underlies Indefatigable Release at the Hair Cell Afferent Fiber Synapse. *Neuron* 70:326-338.
- Schnee ME, Ricci AJ (2003) Biophysical and pharmacological characterization of voltage-gated calcium currents in turtle auditory hair cells. *J Physiol* 549:697-717.
- Seiler C, Nicolson T (1999) Defective calmodulin-dependent rapid apical endocytosis in zebrafish sensory hair cell mutants. *J Neurobiol* 41: 424-434.
- Singh A, Gebhart M, Fritsch R, Sinnegger-Brauns MJ, Poggiani C, Hoda JC, Engel J, Romanin C, Striessnig J, Koschak A (2008) Modulation of voltage- and Ca<sup>2+</sup>-dependent gating of CaV1.3 L-type calcium channels by alternative splicing of a C-terminal regulatory domain. *J Biol Chem* 283: 20733-20744.
- Skinner LJ, Enée V, Beurg M, Jung HH, Ryan AF, Hafidi A, Aran JM, Dulon D (2003) Contribution of BK Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels to auditory neurotransmission in the Guinea pig cochlea. *J Neurophysiol* 90(1):320-32.
- Spassova MA, Avissar M, Furman AC, Crumling MA, Saunders JC, Parsons TD (2004) Evidence that rapid vesicle replenishment of the synaptic ribbon mediates recovery from short-term adaptation at the hair cell afferent synapse. *J Assoc Res Otolaryngol* 5: 376-390.
- Striessnig J, Pinggera A, Kaur G, Bock G, Tuluc P (2014) L-type Ca channels in heart and brain. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 3: 15-38.
- Tan BZ, Jiang F, Tan MY, Yu D, Huang H, Shen Y, Soong TW (2011) Functional characterization of alternative splicing in the C terminus of L-type CaV1.3 channels. *J Biol Chem* 286: 42725-42735.
- Vincent PF, Bouleau Y, Safieddine S, Petit C, Dulon D (2014) Exocytotic machineries of vestibular type I and cochlear ribbon synapses display similar intrinsic otoferlin-dependent Ca<sup>2+</sup> sensitivity but a different coupling to Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurosci* 34: 10853-10869.
- Zhang Z, Xu Y, Song H, Rodriguez J, Tuteja D, Namkung Y, Shin HS, Chiamvimonvat N (2002) Functional Roles of Ca(v)1.3 (alpha(1D)) calcium channel in sinoatrial nodes: insight gained using gene-targeted null mutant mice. *Circ Res* 90: 981-987.

## LEGENDS

**Figure 1: Nifedipine-resistant  $\text{Ca}^{2+}$  current in mature IHCs**

(A) IV-ramp activation curve of  $\text{Ca}^{2+}$  currents from -90 mV to +30 mV in *wild type* (WT) mice, without nifedipine (control condition, black), with 20  $\mu\text{M}$  of nifedipine (green) and after the UV flash inactivation of nifedipine (purple). Inset shows the Boltzmann parameters (half maximum voltage activation,  $V_{1/2}$  and slope K) obtained by fitting the IV curve from -70 mV to -10 mV with a Boltzmann sigmoidal function in the three different conditions. (B) Same protocol as in A for comparison between WT (black, same trace as in A) and otoferlin-deficient mice (*Otof*<sup>-/-</sup>, red). Inset shows the Boltzmann parameters ( $V_{1/2}$  and slope K) for WT and *Otof*<sup>-/-</sup>. (C, D, E) Example of  $\text{Ca}^{2+}$  current traces in response to a paired pulse of 100 ms depolarization from -80 mV (resting potential) to -10 mV. For control condition (C) and in the presence of 20  $\mu\text{M}$  nifedipine (D), we applied a third 100 ms stimulation after the UV flash to test the UV unblocking of  $\text{Ca}^{2+}$  channels. (F, G) Top traces show the inactivating  $\text{Ca}^{2+}$  currents (mean  $\pm$  SEM) obtained after subtracting the second pulse response from the first. Histograms show the amplitudes and inactivation-time constants of the subtracted  $\text{Ca}^{2+}$  currents obtained in different conditions: control condition (black), with nifedipine (green), and in *Otof*<sup>-/-</sup> without nifedipine (red). Amplitude of inactivation was measured between the  $\text{Ca}^{2+}$  peak and the steady state of inactivation (blue dashed lines in F). The fast-inactivating time constant was determined by fitting the current decrease with an exponential function (red line in F). Error bars indicate SEM. Nif (-): condition without nifedipine; Nif (+): condition with 20  $\mu\text{M}$  nifedipine. \* $p < 0.05$ .

**Figure 2: RRP exocytosis is weakly affected by nifedipine**

(A, B, C) Examples of capacitance response ( $\Delta C_m$ , top) and  $\text{Ca}^{2+}$  currents (bottom) recorded in response to a 100 ms paired-pulse stimulation: (A) control condition, (B) condition with 20  $\mu\text{M}$  extracellular nifedipine, (C) condition with 5 mM intracellular EGTA and 20  $\mu\text{M}$  extracellular nifedipine. (D) Comparative histograms of  $\Delta C_m$  and  $\text{Ca}^{2+}$  currents recorded in control condition (black), with nifedipine (green), with nifedipine and 5 mM EGTA (blue) and in *Otof*<sup>-/-</sup> without nifedipine (red). Filled histograms show data from the first pulse (P1,  $\Delta C_{m1}$ ) and hatched histograms from the second pulse (P2,  $\Delta C_{m2}$ ).  $\Delta C_{m1}$  was calculated as the difference between responses at P1 and baseline (red dotted line).  $\Delta C_{m2}$  was calculated as the difference between responses at P2 and P1. (E) Comparative histograms of  $\Delta C_m$  P2/P1 ratio. (F, G)  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency of RRP exocytosis in response to various voltage steps (F) in the presence of 20  $\mu\text{M}$  nifedipine before (green) and after UV-unblocking  $\text{Ca}^{2+}$  currents (purple) in WT-IHCs. Error bars indicate SEM. Nif (-) indicates condition without nifedipine and Nif (+) condition with 20  $\mu\text{M}$  nifedipine. \* $p < 0.05$ .

**Figure 3: Extracellular nifedipine does not block  $\text{I}_{\text{CaTB}}$** 

These results suggest that the nifedipine-resistant  $\text{Ca}^{2+}$  currents originate from the Cav1.3 short isoforms associated with the RRP fusion.

(A) Two examples of simultaneous recordings of  $\text{Ca}^{2+}$  currents ( $\text{I}_{\text{Ca}}$ ) and capacitance jump ( $\Delta C_m$ ) in a P17-mice IHCs in the presence of 25 mM bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) as a weak  $\text{H}^+$  buffer in the extracellular solution. Cells were depolarized from -80 mV (resting potential) to -10 mV for 100 ms (top). The green traces were obtained from an IHC incubated with 20  $\mu\text{M}$  nifedipine.

(B) The two histograms at left display the mean  $\pm$  SEM of  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  amplitudes expressed in pA, and as a percentage of the total  $\text{Ca}^{2+}$  current. The two histograms at right indicate the activation time constants of  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  (single exponential fit) and  $\Delta C_m$ . The green bars were obtained from IHCs incubated with 20  $\mu\text{M}$  nifedipine in the extracellular solution. The method

used to measure each parameter is indicated above the histograms. Number of cells is indicated in the two first histograms.

**C)** Example of  $I_{CaTB}$  and exocytosis in response to a train of five 100 ms-stimulations from -80 to -10 mV, each step separated by 100 ms, in presence of 25 mM  $HCO_3^-$  alone or with 20  $\mu$ M nifedipine in the extracellular solution

**D)** The capacitance jump obtained at each step are plotted against their corresponding  $I_{CaTB}$ . Note that the linear correlation is maintained when nifedipine is added in the extracellular solution (green).

**Figure 4: nifedipine greatly reduces sustained exocytosis**

Examples of comparative changes in  $\Delta C_m$  and  $Ca^{2+}$  currents in control conditions (**A**) and in the presence of 20  $\mu$ M extracellular nifedipine (**B**) when applying a train of 100 ms stimulations. Dashed purple arrows indicate the illumination with UV. (**C**) Plot of the sequential, 5 first, mean  $\Delta C_m$  and  $Ca^{2+}$  current responses before and after the UV flash: control condition (black), condition with 20  $\mu$ M nifedipine (green), condition with EGTA (5mM) and nifedipine (blue). (**D**) Similar comparative plot in control condition for *WT*-IHCs (black dashed line) and *Otof*<sup>-/-</sup>IHCs (red). Note the latency of  $\Delta C_m$  response after UV-unblocking  $Ca^{2+}$  channels in the presence of nifedipine (**B**, **C**). Error bars indicate SEM.

**Figure 5:  $Ca^{2+}$  imaging during a train of stimuli reveals a fast synaptic response and a delayed, slowly developing sub-cuticular plate response**

**(A, B)** Examples of simultaneous recording of  $Ca^{2+}$  current (top) and capacitance response (bottom) in control condition (**A**) and in the presence of 20  $\mu$ M nifedipine (**B**) for *WT*-IHCs during a train of 100 ms stimulations from -80 mV to -10 mV. Simultaneous intracellular  $Ca^{2+}$  increase (mean  $\pm$  SEM) was recorded in IHCs expressing the fast  $Ca^{2+}$  indicator, GCaMP6f, in control condition (**C**) and in the presence of nifedipine (**D**). Insets in **C** and **D** show examples of fluorescent IHCs expressing GCaMP6f. Black and orange boxes are the selected region of interest (ROI) for fluorescence measurements at the synaptic and sub-cuticular plate regions, respectively. Purple arrows and dotted lines represent the timing of UV-unblocking  $Ca^{2+}$  channels. The red circle with N indicates the position of the nucleus.

Superimposed  $Ca^{2+}$  currents (top) and synaptic intracellular  $Ca^{2+}$  measurement (bottom) are shown during the first 10 stimuli for control (**E**) and nifedipine conditions (**F**). Note that the fast transient inactivating component of  $Ca^{2+}$  current (asterisk) coincided with the first phase (Ph. 1) of  $Ca^{2+}$  increase, whereas the second phase (Ph. 2) mirrored the sustained  $Ca^{2+}$  current. Comparative histograms of the rates of  $Ca^{2+}$  increase in the basal synaptic region (SR) and the region above the nucleus (NR) in control and nifedipine conditions are shown in (**G**) and (**H**), respectively. Phase number (Ph. number) “1”, “2” and “3” correspond to Ph. 1, Ph. 2 and Ph. 3 (post-UV) in **C** and **D**, respectively. Rates were obtained by fitting Ph. 1, Ph. 2 and Ph. 3 with a linear function. (**H'**) Magnification of the Ph. 1 and Ph. 2 responses recorded at the sub-cuticular plate region shown in G-H, in control and nifedipine conditions. \* $p < 0.05$ .

**Figure 5:  $Ca^{2+}$  imaging and immunohistochemistry localize  $Ca^{2+}$  channels below the cuticular plate region of IHCs**

**(A, B)** Example of simultaneous recording of  $Ca^{2+}$  current (top) and capacitance response (bottom) in control condition (**A**) in a *WT*-IHC evoked during a single 500 ms step depolarization from -80 mV to -10 mV. A simultaneous intracellular  $Ca^{2+}$  increase was recorded through the fast  $Ca^{2+}$  indicator, GCaMP6f (**B-C**).  $Ca^{2+}$  signals were measured from the synaptic zone (black line), above the nucleus (orange line) and under the cuticular plate region (blue line) as indicated in (C) showing a row of IHCs genetically expressing the  $Ca^{2+}$  indicator GCaMP6f. Boxes represent the region of interest (ROI) used for the

Ca<sup>2+</sup> measurement shown in **B**.  $\Delta t$  represents the time difference between the peak of intracellular Ca<sup>2+</sup> measured at the synaptic area and the region above the nucleus. **(D)** Typical example of Cav1.3 immunolabelling at the apical turn of a whole-mount organ of Corti from a P14 mouse. F-actin was labeled in pink, otoferlin in blue, CtBP2 (ribbon) in red and Cav1.3 in green. Right top panel shows the cuticular plate region at higher magnification and the small clusters of Cav1.3 (arrow heads). Right bottom panel shows two synaptic active zones at higher magnification.

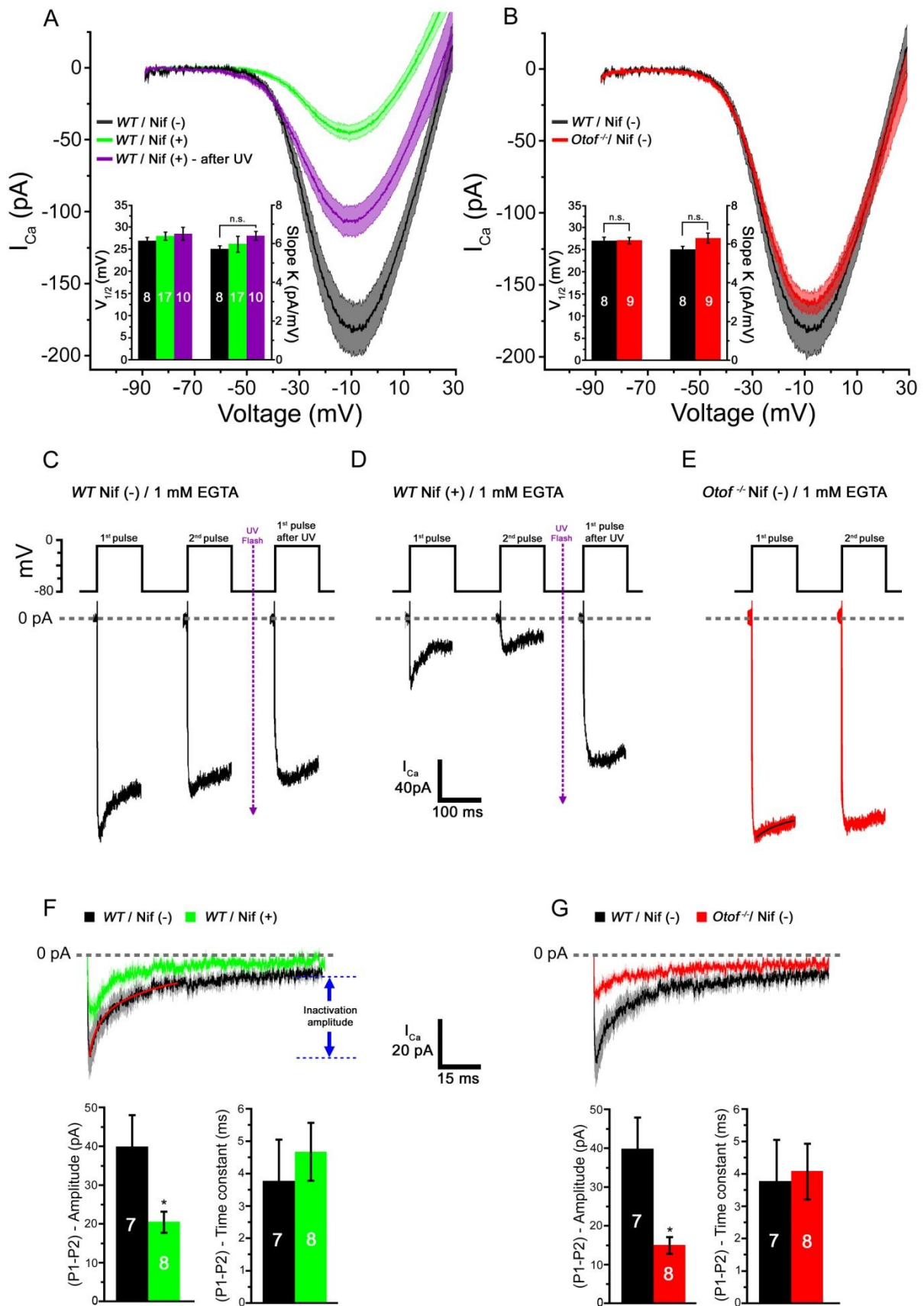
**Figure 7: Fast Ca<sup>2+</sup> uncaging in the presence of nifedipine reveals a depressed RRP** Exocytotic responses ( $\Delta C_m$ ) triggered by UV flash in control condition (black, **A** and **C**), in the presence of 20  $\mu$ M nifedipine (green, **A**) or in the presence of 10  $\mu$ M of BayK8644 (grey, **C**). Plots in **B** and **D** show the first 200 ms of the  $\Delta C_m$  responses displayed in **A** and **C**, respectively. The exocytotic responses could typically be described by a sigmoidal curve, displaying a first slow rise (called loading step or LS, blue arrows) followed by a steep acceleration and finally a slow down before a plateau. The LS rate was measured for each IHC by fitting the first part of the sigmoidal curve with a linear function. The LS amplitude corresponded to the inflection point between the slow and steep part of the sigmoidal curve. The latency of the response (L, black arrows) was measured between the start of the flash and the first significant rise in capacitance. LS<sup>C</sup>: Loading Step in control condition; LS<sup>N</sup>: Loading Step with nifedipine; LS<sup>B</sup>: Loading Step with BayK8644. Latency was the time between the UV flash (Purple arrow and dotted lines) and the first significant capacitance increase (LS). L<sup>C</sup>: latency in control condition, L<sup>N</sup>: latency with nifedipine and L<sup>B</sup>: latency with BayK8644. Results are presented as mean  $\pm$  SEM.

**Figure 8: Transcript mRNA expression of Cav1.3 short and long isoforms**

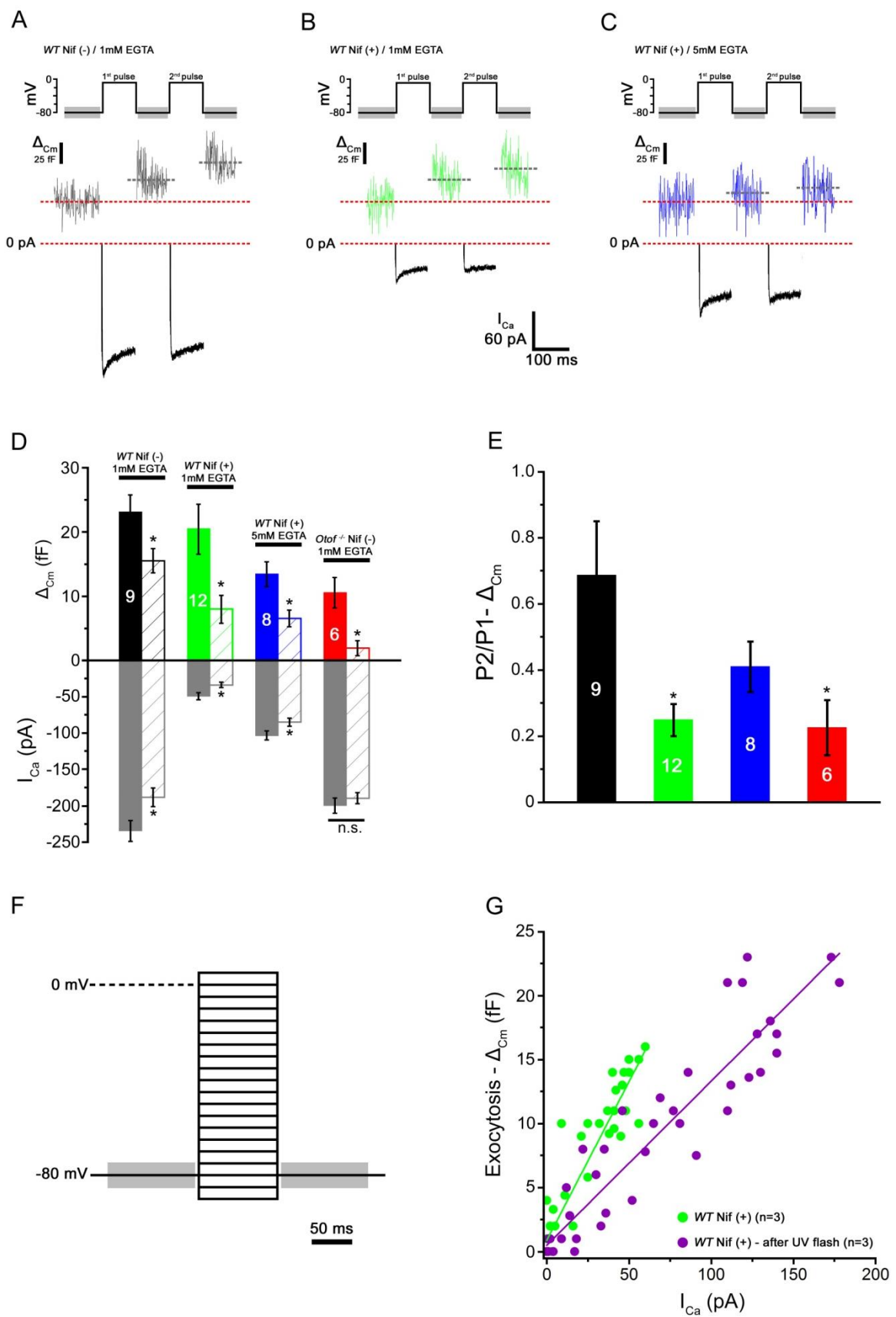
**(A)** RT-PCR expression of Myosin VIIa (Myo VIIa, top left), 42L isoform (long Cav1.3 isoform, bottom left) using 4664s/4995as, both 43S and 42L isoforms using 5010s/5637as (top right) and 42A (bottom right) in P35 *Otof*<sup>+/-</sup> (heterozygous: H) and *Otof*<sup>-/-</sup> (KO) organs of Corti. **(B)** Schematic presentation of alternative splicing of Cav1.3 carboxyl terminus (c-term) domain for long isoform 42L (top), short isoform 43S (middle) and short isoform 42A (bottom). Black and blank rectangles represent constitutive and alternative splicing, respectively. Incorporation of exon 42A instead of exon 42 induces a premature nonsense codon leading to a truncated c-term domain. Orange box represents the lack of 155 nucleotides in the 43S sequence inducing a premature nonsense codon and a truncated c-term domain. Under each sequence, a schematic drawing of the translated  $\alpha_{1D}$  c-term domain controlling Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation (EF: EF hand domain; preIQ and IQ domain, proximal (PCDR) and distal (DCRD) carboxy-terminal regulatory domain) is shown. **(C, D)** Real-time semi-quantitative PCR from P35 *Otof*<sup>+/-</sup> (black) and *Otof*<sup>-/-</sup> (red) organs of Corti for short isoforms 43S (**C**) and 42A (**D**). Green dotted line represents the cycle threshold (Ct). **(E)** RT-PCR from pooled *WT*-IHCs shows the expression of short (43S and 42A) and long (42L) Cav1.3 isoforms. ES: Extracellular solution was used as negative control. **(F)** Stack-reconstructed confocal images from P16 *Otof*<sup>+/-</sup> and *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs at the apical turn of organ of Corti. Tissues were immunolabeled for CtBP2 (ribbons; red), otoferlin (blue), VGLUT-3 (green). **(G, H)** Comparative number of ribbons per cell (**G**) and distribution of ribbon surface area (**H**) in *Otof*<sup>+/-</sup> (black) and *Otof*<sup>-/-</sup> (red) IHCs. \*p<0.05.

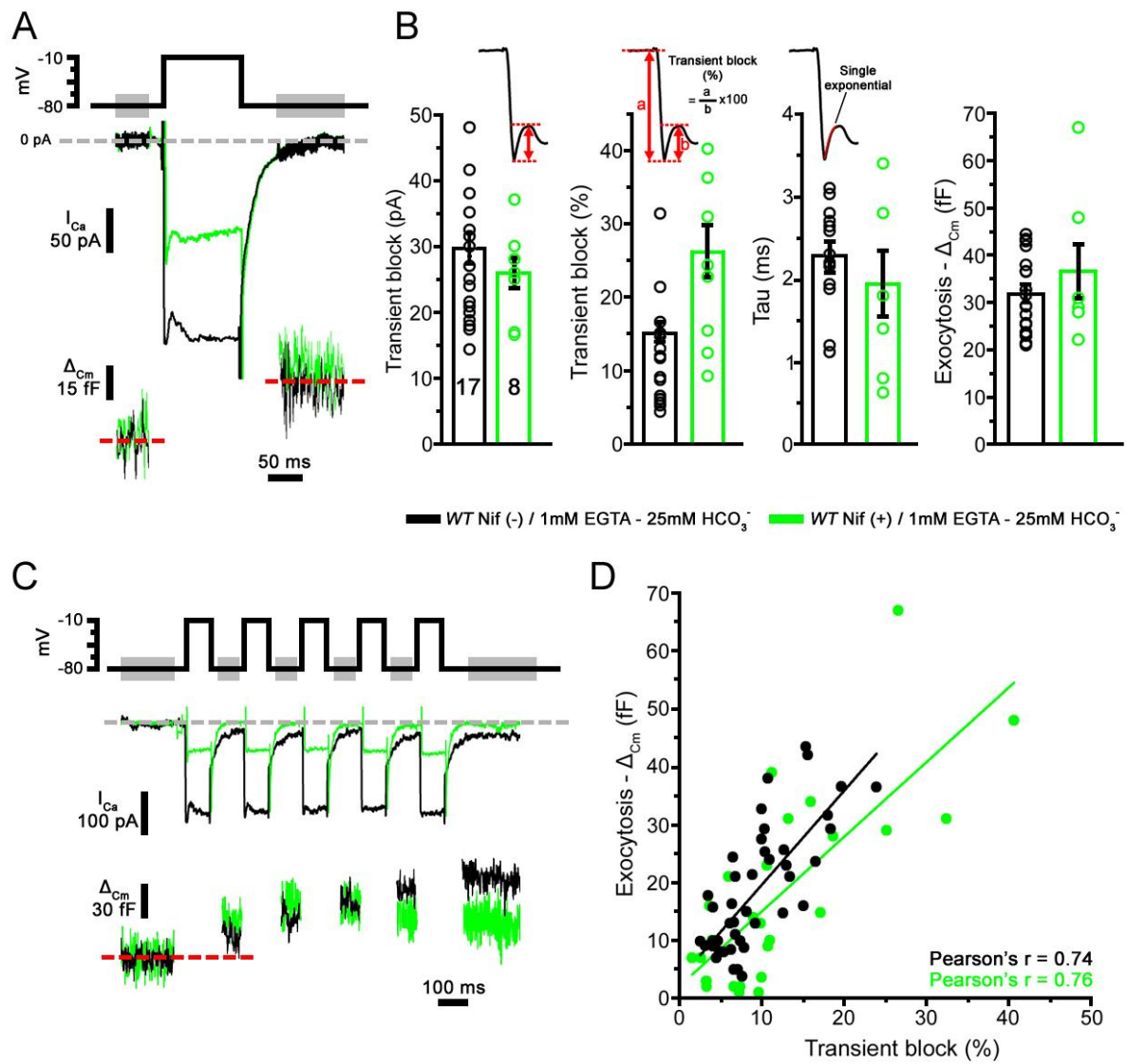
**Table 1:** Summary data (mean  $\pm$  SEM) of Ca<sup>2+</sup> uncaging experiments displayed in Fig. 5. Max amp and Max rate indicate maximum amplitude and maximum rate of the exocytotic response; LS: Loading Step; Amp of LS: amplitude of Loading Step, see legends of Fig 5.

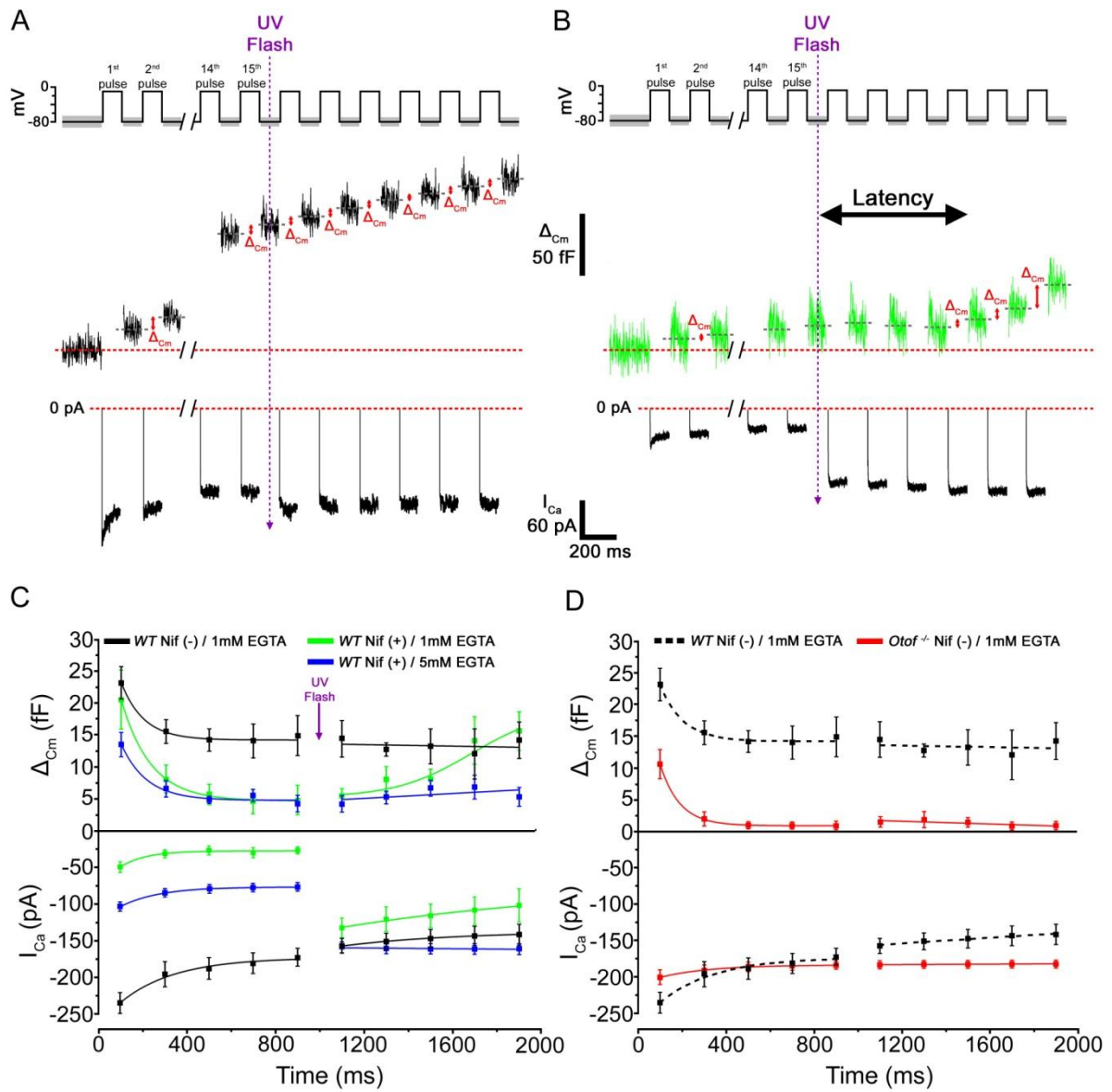
**Supp figure 1: Fast UV reactivation of Ca<sup>2+</sup> currents in the presence of extracellular nifedipine.** (A) Example of Ca<sup>2+</sup> current trace recorded in response to a train of 100 ms stimulation from -80 to -10 mV. The purple arrow indicates the UV flash reactivation of Ca<sup>2+</sup> current. (B) Magnification from blue dashed box in A. We used a double exponential function (red line) to fit the kinetics of unblocking Ca<sup>2+</sup> current. Mean kinetics are plotted in (C).

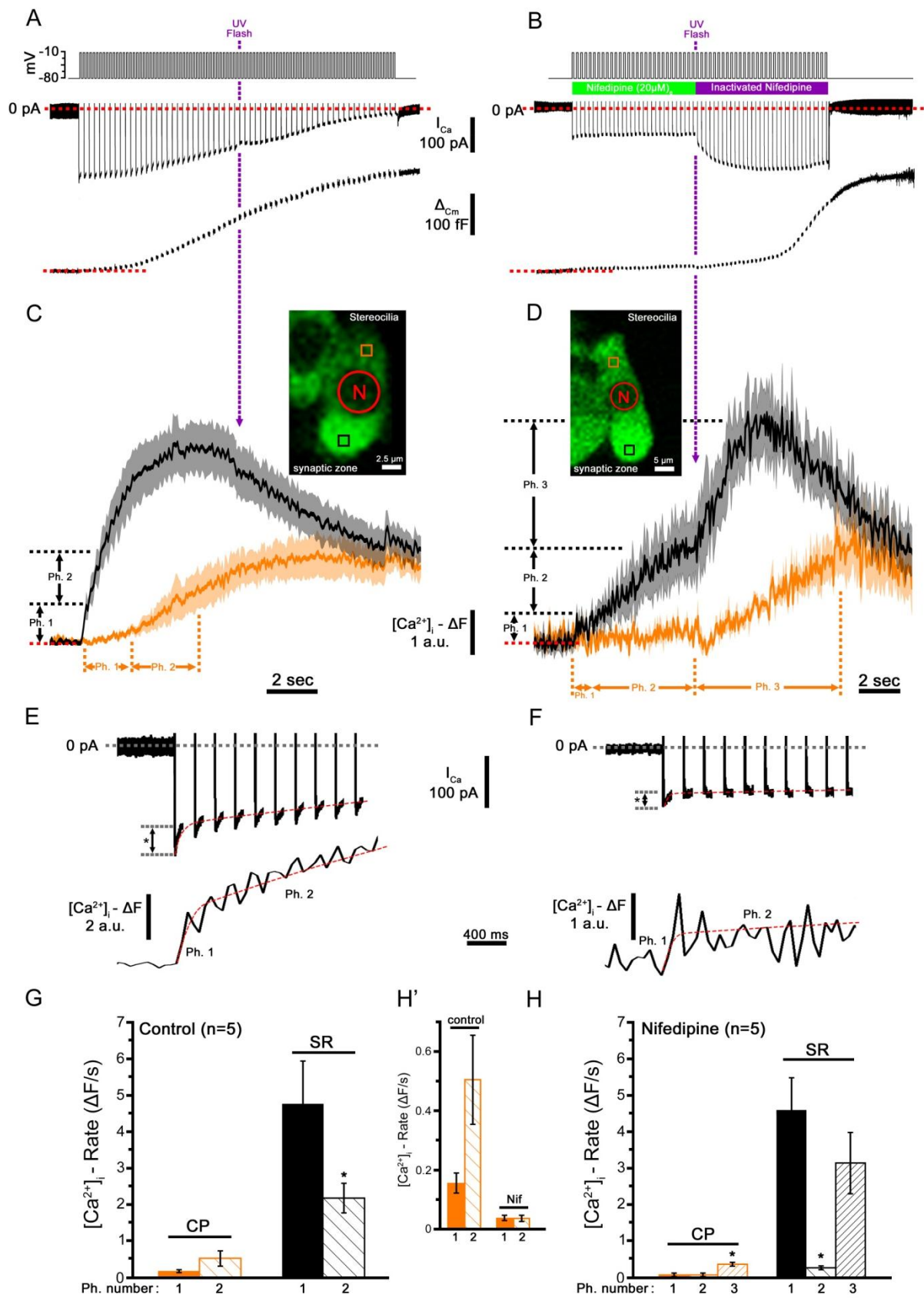


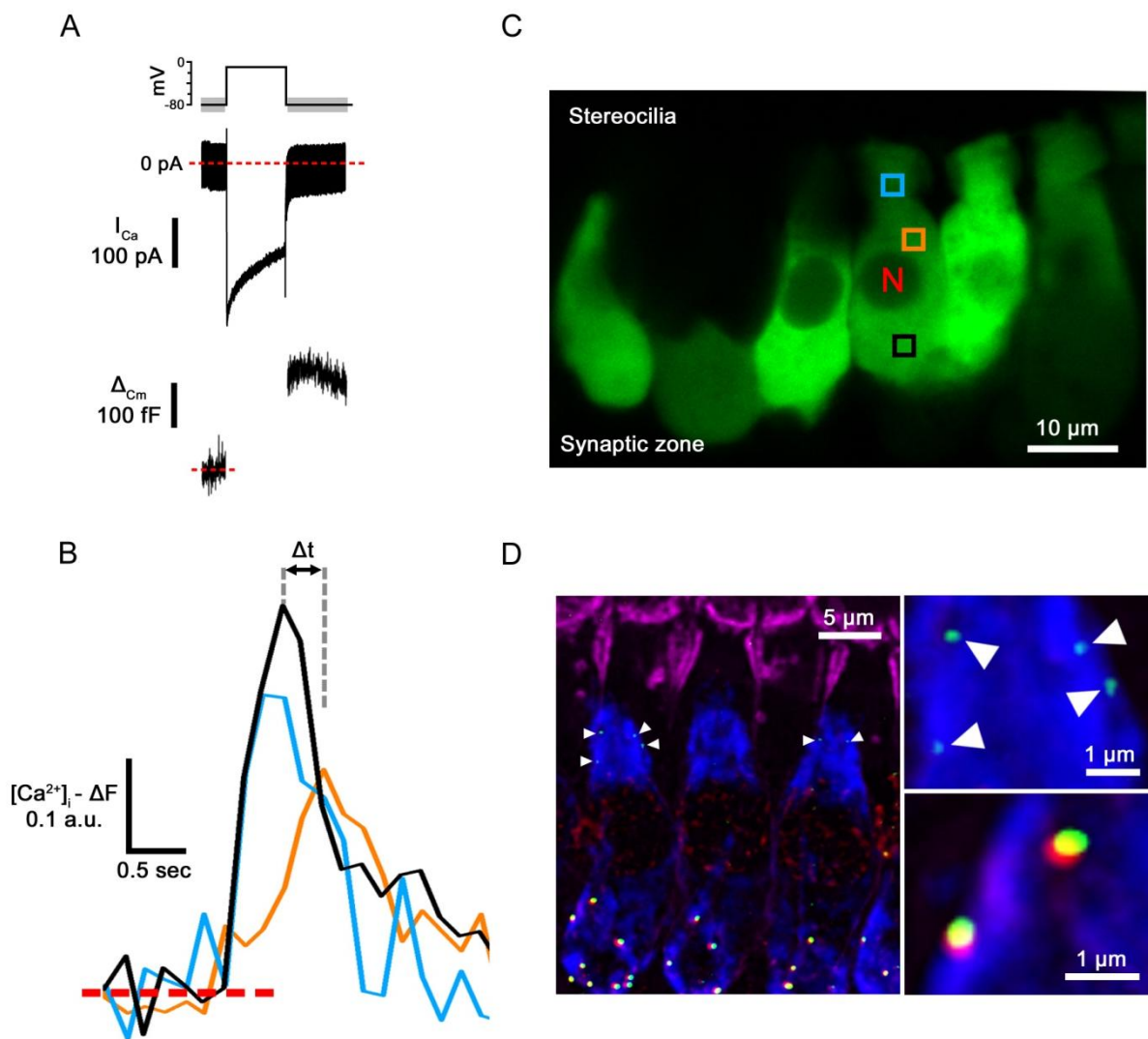


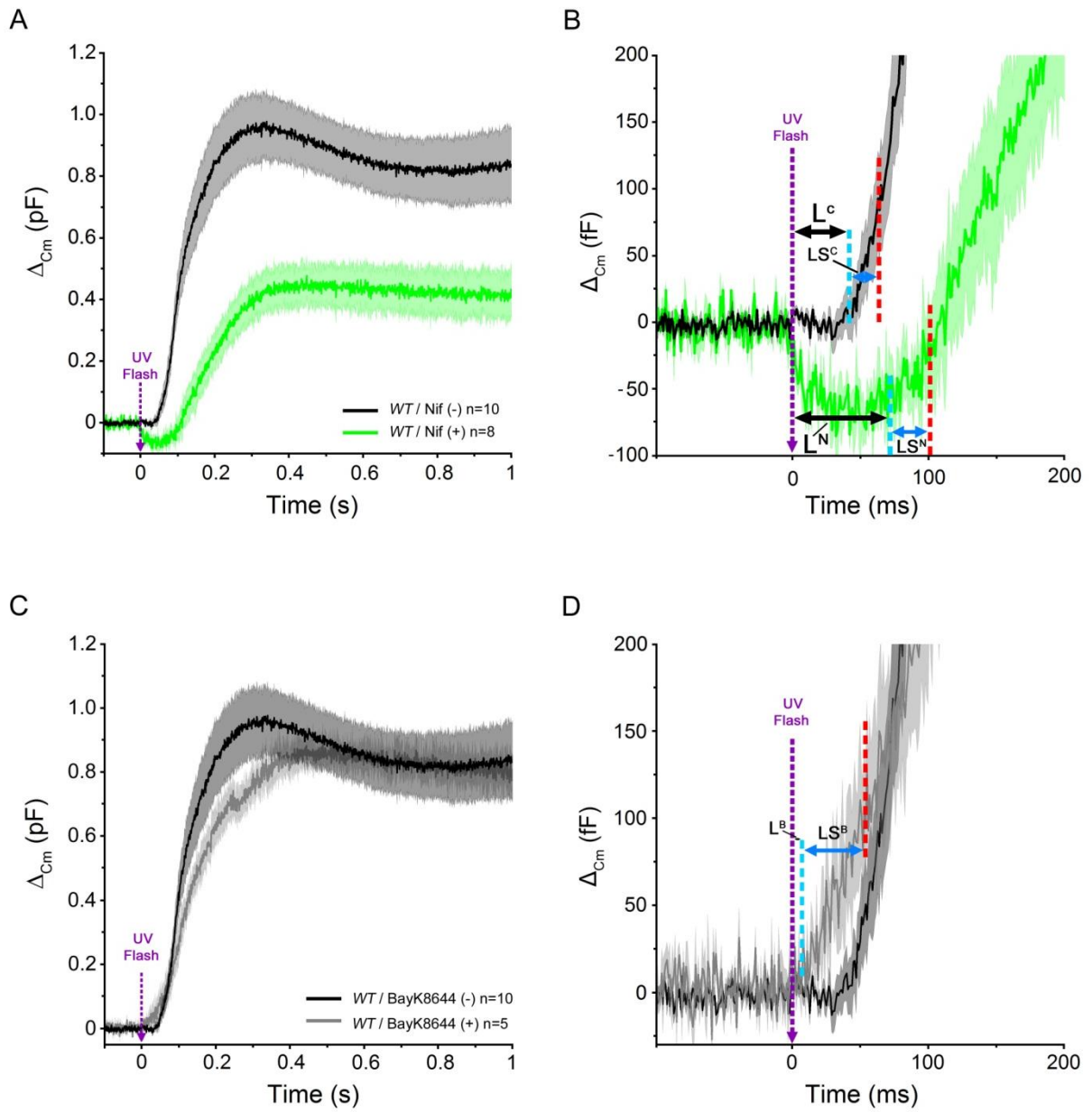




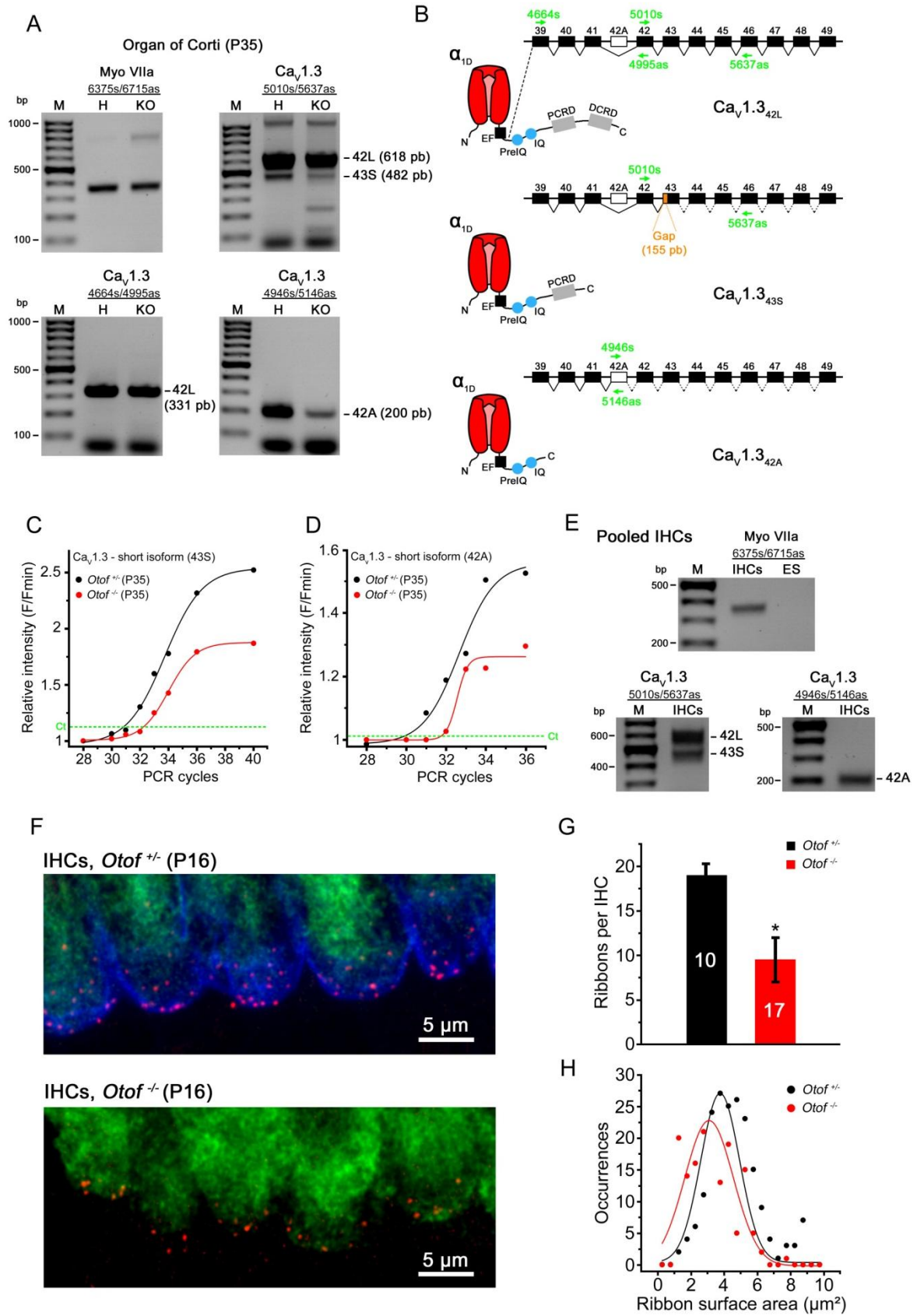






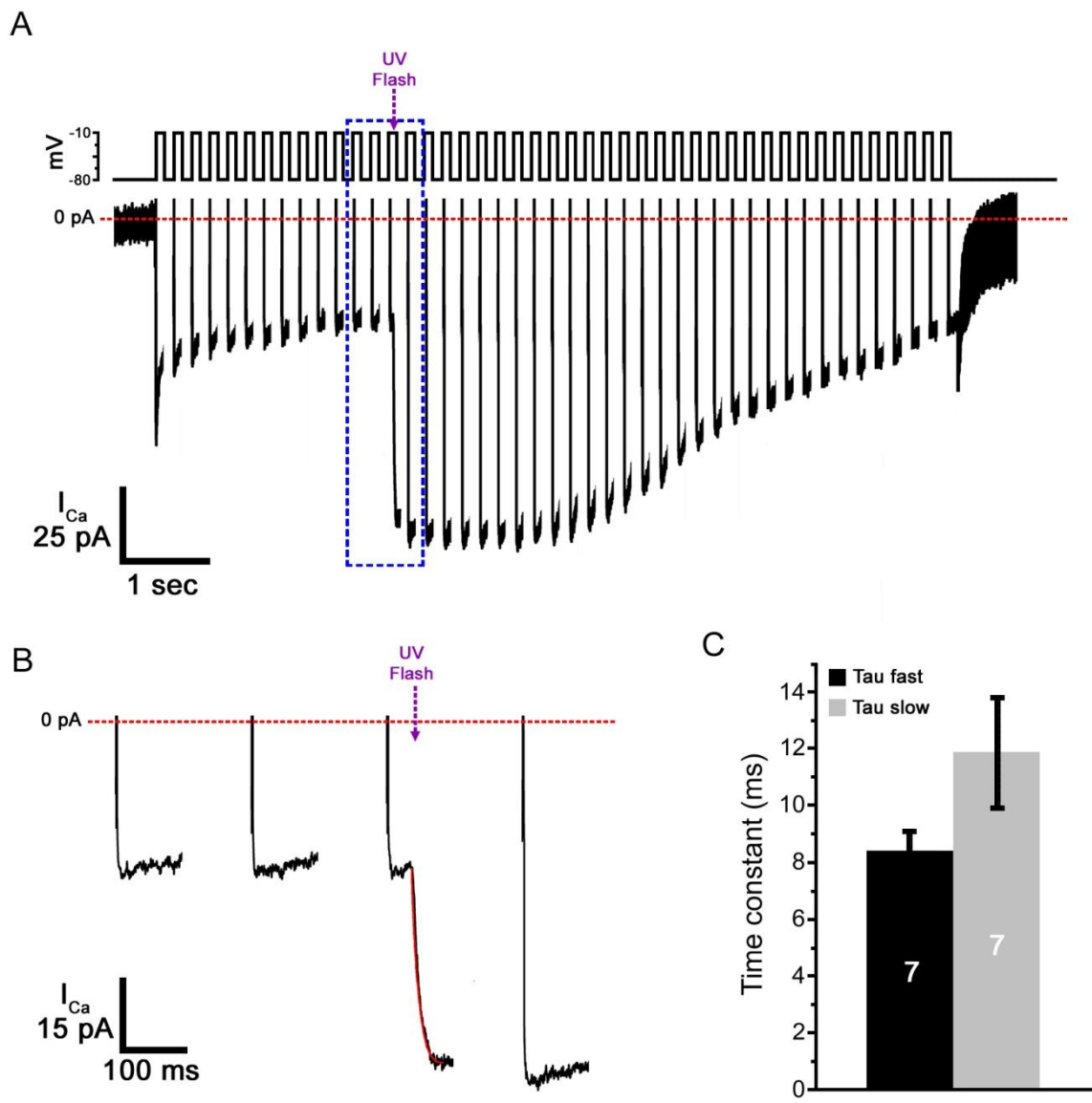








	Max amp (fF)	Latency (ms)	Max Rate (pF/s)	Rate of LS (pF/s)	Duration of LS (ms)	Amp of LS (fF)
<b>IHCs, P12-P16</b>						
<b>Control, Nif (-)</b>	916.5 ± 71.6 (n = 11)	43.4 ± 4.2 (n = 12)	13.5 ± 2.5 (n = 10)	2.0 ± 0.2 (n = 10)	37.2 ± 3.6 (n = 10)	75.6 ± 10.6 (n = 10)
<b>Control, Nif(+)</b>	570.2 ± 42.1 (n = 9)	70.3 ± 7.7 (n = 9)	3.6 ± 0.5 (n = 9)	1.4 ± 0.2 (n = 9)	49.5 ± 7.1 (n = 9)	65.7 ± 6.8 (n = 9)
<b>Control, BayK8644 (+)</b>	877.0 ± 26.2 (n = 4)	4.8 ± 3.8 (n = 4)	6.7 ± 1.1 (n = 4)	1.6 ± 0.4 (n = 4)	54.0 ± 17.3 (n = 4)	128.3 ± 6.1 (n = 4)



## **Article 3**

**Transient Block of Ca<sup>2+</sup> Channels by Exocytosed Protons Reveals Otoferlin-Regulated Multivesicular Release at Mammalian Auditory Hair Cell Ribbon Synapses**

**Philippe FY Vincent**, Soyoun Cho, Yohan Bouleau, Brad Buran, M. Charles Liberman  
Christine Petit, Henrike von Gersdorff and Didier Dulon (2015). En préparation

## **Introduction**

Nous avons ici étudié, pour la première fois, l'effet inhibiteur des  $H^+$  sur les courants calciques et l'exocytose des CCI de souris et de gerbille.

## **Résultat**

- Les courants calciques des CCI présentent une adaptation (inactivation) rapide (2 ms) et transitoire ( $I_{CaTB}$ ) par les  $H^+$  sécrétés en extracellulaire lors de l'exocytose.
- Il existe une corrélation linéaire entre l'amplitude de l' $I_{CaTB}$  et l'amplitude de l'exocytose.
- L' $I_{CaTB}$  est aboli en présence de 10 mM HEPES extracellulaire, une molécule tamponnant très rapidement les  $H^+$ , suggérant que cette adaptation est régulée par l'acidification de la fente synaptique.
- L' $I_{CaTB}$  est conservé lorsque l'on ajoute 20  $\mu$ M de nifédipine dans le milieu extracellulaire suggérant que fusion du RRP est suffisante pour observer cet effet. (Expériences menées dans l'article 2)
- L' $I_{CaTB}$  est abolie lorsque l'exocytose est désynchronisée par 5 mM BAPTA intracellulaire, un tampon calcique très rapide, suggérant que cette inactivation provient de la fusion synchrone des vésicules aux ZAs.
- L' $I_{CaTB}$  est aussi réduite chez les souris déficientes pour l'otoferline, dans lesquelles l'exocytose est très largement diminuée et désynchronisée, suggérant encore que cet effet est lié à la libération de  $H^+$  lors de la fusion vésiculaire.

## **Conclusion**

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les CCI sont capables de réguler leur propre niveau d'exocytose par la libération ultra rapide de  $H^+$ . Ce relargage de  $H^+$  permettrait un rétrocontrôle ultra-rapide sur le courant calcique. Les cinétiques très rapides de cette adaptation (proche de la milliseconde) pourraient être à l'origine de l'adaptation rapide des vitesses de décharge des fibres afférentes du nerf auditif. Le décours temporel des  $I_{CaTB}$  se rapproche de celui des courants post-synaptiques (EPSCs) présentant des décours mono- et multiphasiques nous offrant ainsi, un outil pour comprendre le mode de fusion des CCI. Nous postulons que l'exocytose évoquée des CCI suit le mode de fusion multi-vésiculaire (MVR) dont la synchronisation dépendrait en partie de l'otoferline.

**TRANSIENT BLOCK OF Ca<sup>2+</sup> CHANNELS BY EXOCYTOSED PROTONS  
REVEALS OTOFERLIN-REGULATED MULTIVESICULAR RELEASE  
AT MAMMALIAN AUDITORY HAIR CELL RIBBON SYNAPSES**

**Philippe FY Vincent<sup>1</sup>, Soyoun Cho<sup>5</sup>, Yohan Bouleau<sup>1</sup>, Brad Buran<sup>4</sup>, M. Charles  
Lieberman<sup>4</sup>,  
Christine Petit<sup>2,3</sup>, Henrike von Gersdorff<sup>5\*</sup> and Didier Dulon<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Université de Bordeaux, Institut des Neurosciences de Bordeaux, Equipe Neurophysiologie de la Synapse Auditive, Inserm U1120, 33076 Bordeaux, France,

<sup>2</sup>Institut Pasteur et Université Pierre et Marie Curie, Unité de Génétique et Physiologie de l'Audition, Inserm Unité Mixte de Recherche en Santé 1120, 75015 Paris, France

<sup>3</sup>Collège de France, 75005 Paris, France

<sup>4</sup>Eaton-Peabody Laboratory, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Harvard Medical School, BostonMA 02114

<sup>5</sup>The Vollum Institute, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon 97239.

\* Corresponding authors: didier.dulon@inserm.fr or vongersd@ohsu

**ABSTRACT**

We show that the release of protons during exocytosis produces a fast transient block of  $\text{Ca}^{2+}$  currents ( $I_{\text{CaTB}}$ ) in mammalian auditory hair cell cells (IHCs). Our results suggest that  $I_{\text{CaTB}}$  provides a fast feedback mechanism that reduces transmitter release at the IHC ribbon active zones and in turn adapts the discharge rate of the postsynaptic auditory nerve fibers. Considering  $I_{\text{CaTB}}$  as a mirror of the EPSC events, we then explored the mechanisms of transmitter release in IHCs. Upon voltage-depolarization, we found that the amplitude of the first large  $I_{\text{CaTB}}$  event (synchronized release) displayed a multi-Gaussian distribution, likely corresponding to the simultaneous fusion of 2 to 9 synaptic vesicles per ribbon. This multivesicular process was  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and required otoferlin as a putative  $\text{Ca}^{2+}$  sensor. Small asynchronous  $I_{\text{CaTB}}$  events, following the first large event, were found to be  $\text{Ca}^{2+}$  independent and were significantly diminished in amplitude in mouse IHCs lacking otoferlin.

## INTRODUCTION

Fast transient block of  $\text{Ca}^{2+}$  channels ( $I_{\text{CaTB}}$ ) by exocytosed protons occurs at photoreceptor, retinal bipolar and auditory amphibian synapses (DeVries 2001; Palmer *et al.* 2003; Cho and von Gersdorff, 2014). This  $\text{H}^+$  regulation on  $\text{Ca}^{2+}$  channels is believed to provide a fast feedback mechanism that efficiently adapts transmitter release. At these ribbon synapses, the amplitude of  $I_{\text{CaTB}}$  was found to be linearly correlated with the EPSC amplitudes, indicating that  $\text{Ca}^{2+}$  channels constitute good sensors of synaptic activity. The mechanism of  $I_{\text{CaTB}}$  is explained by the highly acidified content of the synaptic vesicles that is released concomitantly with glutamate in the synaptic cleft during vesicular release. This massive release of  $\text{H}^+$  ions produces a fast transient block of nearby  $\text{Ca}^{2+}$  channels. These channels are located within few tens of nanometers from the sites of vesicular release (Brandt *et al.*, 2005; Graydon *et al.*, 2011; Vincent *et al.*, 2014). Such pH regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels has not yet been described in mammalian auditory hair cells, presumably because all previous studies used a high extracellular concentration of the strong organic pH buffer HEPES. The aim of the present study was to demonstrate that  $I_{\text{CaTB}}$  also occurs during exocytosis in mammalian auditory hair cells, when these cells are bathed in an extracellular solution containing the physiological weak pH buffer bicarbonate, instead of HEPES.

Notably, transmitter release at mammalian auditory hair cell ribbon synapses has been proposed to involve multivesicular release in order to achieve efficient high-frequency transmission (Glowatzki and Fuchs, 2002; Goutman and Glowatzki 2007). In these latter studies, the amplitude and the waveform of the EPSCs were shown to vary greatly during asynchronous (spontaneous) and synchronous release, suggesting that multiple vesicles can be released in a more or less coordinated fashion. Surprisingly, the rate of the EPSCs (i.e the release probability) was found to be  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent but not the mean amplitude of the post-synaptic events. To explain this behavior, a recent study, based on the analysis of spontaneous EPSCs recorded from mouse IHC boutons, proposed unquantal release through a dynamic fusion pore as a candidate mechanism of hair cell exocytosis (Chapochnikov *et al.*, 2014). Multiquantal release has also been proposed to occur during hair cell synaptic transmission in the bullfrog auditory papilla, where small and large-amplitude EPSCs were recorded (Keen and Hudspeth, 2006; Li *et al.*, 2009). At these amphibian synapses, EPSC amplitudes were found to be  $\text{Ca}^{2+}$  dependent and the  $\text{H}^+$  effect on  $\text{Ca}^{2+}$  current was best explained by a multivesicular process (Cho and von Gersdorff, 2014). The molecular mechanisms of either multivesicular (MVR) or univesicular (UVR) release in hair cells remain uncertain. To clarify these mechanisms of vesicular release in mammalian hair cells, we investigated the role of otoferlin, an essential  $\text{Ca}^{2+}$  sensor for synaptic exocytosis in auditory (Roux *et al.*, 2006; Beurg *et al.*, 2010) and vestibular hair cells (Dulon *et al.*, 2009; Vincent *et al.*, 2014), on  $I_{\text{CaTB}}$ . Since reliable evoked post-synaptic recordings on the tiny post-hearing mammalian IHC boutons *in vitro* are very difficult to obtain, we here used  $I_{\text{CaTB}}$  to probe vesicular release in auditory hair cells from wild-type and otoferlin-lacking mice.



## MATERIAL AND METHODS

### Hair cell recordings from the Bullfrog papilla

Amphibian papillae of adult female or male bullfrogs (*Rana catesbeiana*) were carefully dissected as described by Keen and Hudspeth (2006) and Li *et al.* (2009) following an OHSU (IACUC) approved animal care protocol. Amphibian papillae were placed in a recording chamber with artificial perilymph containing (in mM): 95 NaCl, 2 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 3 Glucose, 1 creatine, 1 Na-pyruvate, pH adjusted to 7.30 with NaOH, and continuously bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> (230 mOsm). Semi-intact preparations of hair cells and their connecting afferent fibers were viewed with an Olympus BX51WI microscope equipped with a 60x water-immersion objective lens (Olympus) and digital CCD camera (QImaging). For whole-cell recordings, patch pipettes of borosilicate glass were pulled to resistances of 6 to 7 MΩ for hair cells and 8 to 9 MΩ for afferent fibers. The control intracellular solution contained (in mM): 77 Cs-gluconate, 20 CsCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 TEA-Cl, 10 HEPES, 2 EGTA, 3 Mg-ATP, 1 Na-GTP and 5 Na<sub>2</sub>-phosphocreatine (adjusted to pH 7.3 with CsOH). For internal solution containing 10 mM BAPTA instead of 2 mM EGTA, the amount of Cs-gluconate was reduced to match osmolarity of 230 mOsm. Oxygenated artificial perilymph continuously perfused (2–3 ml/min) during the recordings. Whole-cell voltage clamp recordings were performed with an EPC-10/2 (HEKA) patch-clamp amplifier and Patchmaster software (HEKA) at room temperature. The resting holding potential of hair cells was -60 mV and that of afferent fibers was -90 mV. Membrane potentials were corrected for a liquid junction potential of 10 mV. Whole-cell calcium currents were not leak-subtracted. The averaged uncompensated series resistances in whole-cell recordings were 12.3 ± 1.0 MΩ for hair cells (n = 7) and 19.6 ± 2.9 MΩ for afferent fibers (n = 7). Whole-cell recordings were electronically compensated by 0% to 63% depending on the uncompensated series resistance. The measurements of the whole-cell membrane capacitance (C<sub>m</sub>) from hair cells were performed under voltage-clamp with the “Sine + DC” method (Lindau and Neher, 1988; Gillis, 2000) using an EPC-10/2 (HEKA) patch-clamp amplifier and Patchmaster software (HEKA). 2 kHz sine waves were superposed on the holding potential of -60 mV and the resulting current response was used to calculate C<sub>m</sub> via a Patchmaster software emulator of a lock-in amplifier (Gillis, 2000). The average whole-cell capacitance of hair cells was 12.6 ± 0.8 pF (n = 7).

### Hair cell recordings from gerbil and mouse organ of Corti

The dissection of the organ of Corti from post-hearing P14-P18 mice and P20-P30 gerbils were performed in accordance with the guidelines of the Animal Care Committee of INSERM and the ethics committee of the University of Bordeaux. All mice (C57BL6 of either sex) and gerbil were anesthetized by intraperitoneal injection of xylazin (6 mg/ml) and ketamin (80 mg/ml) mixture (Sigma Aldrich, St Louis, USA) diluted in physiological saline. Electrophysiological recordings from inner hair cells (IHCs) were obtained in whole-mount organs of Corti. The organ of Corti (OC) was freshly dissected under binocular magnification in an extracellular solution maintained at 4°C containing (in mM): NaCl 135; KCl 5.8; CaCl<sub>2</sub> 1.3; MgCl<sub>2</sub> 0.9; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.7; Glucose 5.6; Na pyruvate 2; HEPES 10, pH 7.4, 305 mOsm. The OC was placed in a recording chamber and the hair cells were observed with a 60x water immersion objective (CFI Fluor 60X W NIR, WD = 2.0 mm, NA = 1) attached to an upright Nikon FN1 microscope. The OC was continuously perfused at a rate of 1 ml/min by using a Masterflex L/S peristaltic pump (model 7519-20, Cole-Palmer Instrument) with a bicarbonate solution, continuously bubbled with carbogen gaz (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>). This solution had the following composition: NaCl 135; KCl 5.8; CaCl<sub>2</sub> 5; MgCl<sub>2</sub> 0.9; Glucose 5.6; Na pyruvate 2; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, pH 7.4, 320 mOsm. This solution was complemented with 0.05 μM of

apamin (Latoxan, Valence, France), 0.02  $\mu\text{M}$  of XE-991 (Tocris Bioscience, Lille, France) and 0.05  $\mu\text{M}$  TTX (Sigma) to block SK channels KCNQ4 channels and  $\text{Na}^+$  channels, respectively. All experiments were carried out at room temperature (22-24  $^{\circ}\text{C}$ ). To preserve the afferent dendrites and improve the survival rate of the afferent synaptic boutons connecting the base of the IHCs, the OC was dissected with its spiral ganglion neurons. Also, we avoided to remove the tectorial membrane on top of the OC, since its removal had the tendency to damage the IHCs and their synaptic boutons. In our preparation, the patch recording electrode was gently slid below the tectorial membrane in order to reach the IHCs.

In mice, all IHC recordings were performed in the 20-40% normalized distance from the apex, an area coding for frequencies ranging from 8 to 16 kHz. Gerbil IHCs were recorded from the apical turn low frequency region coding from 0.5 to 1 kHz. Whole cell patch-clamp recordings were performed by using an EPC10 amplifier controlled by Patchmaster pulse software (HEKA Elektronik, Germany). Patch pipettes were pulled with a micropipette Puller P-97 Flaming/Brown (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) and fire-polished with a Microforge MF-830, (Narishige, Japan) to obtain a resistance range from 3 to 5  $\text{M}\Omega$ . Patch pipettes were filled with an intracellular solution containing (in mM): CsCl 145;  $\text{MgCl}_2$  1; HEPES 5; EGTA 1; TEA 20, ATP 2, GTP 0.3, pH 7.2, 310 mOsm. In a few experiments, the slow  $\text{Ca}^{2+}$  chelator EGTA was increased to 5 mM or replaced by 5 mM BAPTA. Membrane capacitance measurements ( $C_m$ ) were performed using the Patchmaster Lock-in amplifier software (HEKA) as previously described (Vincent *et al.*, 2014).

### Single fiber recordings from the mouse auditory nerve fibers

Recordings from single auditory nerve fibers were performed in C57BL/6J and Sv/129 mice (2 to 3 month old) as previously described in detail (Taberner and Liberman, 2005; Buran *et al.*, 2010). Mice were anesthetized with xylazine (5 mg/kg) and urethane (1.32mg/kg) and placed in a sound-proofed, electrically shielded room, with body temperature maintained at 37 $^{\circ}\text{C}$ . After occipital bone removed, and a partial cerebellar aspiration performed to expose the cochlear nucleus, recording glass microelectrodes, filled with 2 M KCl, were advanced through the cochlear nucleus into the auditory nerve using a stereotaxic apparatus. Criteria for distinguishing auditory nerve fibers from cochlear nucleus neurons included electrode depth ( $> 1000 \mu\text{m}$  rebrainstem surface) and response properties to tone bursts (Taberner and Liberman, 2005): a first spike latency  $< 3 \text{ ms}$  (values not corrected for the acoustic delay) and a coefficient of variation for interspike interval  $> 0.5$ . Post-stimulus onset time and interspike-interval histograms were computed from responses to tone bursts (50 ms) at CF and 30 dB above threshold.

### Data Analysis

Data analysis was performed with Igor Pro software (Wavemetrics), Prism (GraphPad Software) or Origin Software. Statistical significance was assessed with paired Student's *t* tests. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

## RESULTS

### Desynchronizing release with intracellular BAPTA reduces $I_{CaTB}$ in bullfrog hair cells

Since patch-clamp recordings from the tiny post-synaptic boutons of mature post-hearing IHCs are very difficult to perform, we first investigated the relationship between the EPSCs synchrony and the transient block of pre-synaptic  $Ca^{2+}$  currents ( $I_{CaTB}$ ) in hair cells of the adult bullfrog amphibian papillae. The afferent fibers of these hair cells project with a calyx-like terminal, with multiple post-synaptic endings, where EPSCs are easier to perform (or to record?). When the auditory amphibian hair cells are depolarized from -60 mV, close to the physiological resting membrane potential (Crawford and Fettiplace, 1980; Pitchford and Ashmore, 1987), to -30 mV, which activates the peak of  $Ca^{2+}$  currents,  $Ca^{2+}$  currents shows  $I_{CaTB}$  when 2 mM EGTA is used as intracellular  $Ca^{2+}$  buffer (Cho and von Gersdorff, 2014). In this later study,  $I_{CaTB}$  and EPSCs amplitudes were shown to be strongly correlated suggesting that the source of the fast  $I_{CaTB}$  was the vesicular release of  $H^+$  during exocytosis. To examine the mechanisms of the  $H^+$  and glutamate vesicular release we used here 10 mM of the fast  $Ca^{2+}$  chelator BAPTA in the hair cell intracellular recording solution. In these conditions, we found that the initial hair cell  $Ca^{2+}$  current recorded within 1 minute after the whole-cell break-in still showed transient block (black in Fig. 1A1). However, this  $I_{CaTB}$  was gradually decreased and removed in the later recordings measured at 5 minutes after break-in (green and red in Fig. 1A1). The corresponding EPSCs were strongly reduced (green and red in Fig. 1A1). In addition to reducing EPSC charges, 10 mM BAPTA delayed the first synchronous peak of EPSC with dispersed events during the stimulation (Fig. 1A2), which is consistent with mammalian hair cells (Goutman and Glowatzki, 2007). The average EPSC charge was significantly decreased from  $16.8 \pm 4.5$  pC ( $n = 7$ ) in the early recordings (measured within 1 minute since the break-in) to  $2.0 \pm 0.7$  pC ( $n = 7$ ) in the later recordings (measured after 4 minutes since the break-in, Fig. 1B,  $p < 0.01$ , paired t-test). The size of transient block strongly correlates with EPSC amplitudes (Cho and von Gersdorff, 2014). Similarly, when we compared the ratio of  $I_{CaTB}$  to the peak of  $Ca^{2+}$  current between early ( $< 1$  minute) and later recordings ( $> 4$  minutes), it was also significantly decreased in the later recordings ( $n = 7$ , Fig. 1C,  $p < 0.01$ , paired t-test). In summary, 10 mM BAPTA in adult bullfrog hair cells strongly reduced the amplitude of EPSCs by reducing their synchronous release and this is reflected in the concomitant reduction of  $I_{CaTB}$  recorded in the hair cells.

### Proton release triggers fast $I_{CaTB}$ in gerbil and mouse post-hearing IHCs

Similarly to the amphibian auditory hair cells, when continuously perfused with an external bicarbonate/ $CO_2$  solution,  $Ca^{2+}$  currents recorded in IHCs from P20-P30 gerbils and P14-P18 mice (both post-hearing animals) systematically showed a notch or a fast transient block ( $I_{CaTB}$ ) right after their peak onset (Fig. 2A, brown line; Fig. 2B, black line, gerbils and mice IHCs, respectively). The kinetics of  $I_{CaTB}$  were found similar in gerbil and mouse IHCs when fitted with a single exponential (respectively,  $\tau = 2.62 \pm 0.48$  ms ( $n = 7$ ) and  $2.28 \pm 0.17$  ms ( $n = 17$ );  $p = 0.14$  unpaired t-test). The amplitudes of  $I_{CaTB}$ , measured for a voltage-step from -80 mV to -10 mV, were also found similar in both types of mammalian hair cells (respectively in gerbils and mice,  $28.0 \pm 7.1$  pA equivalent to  $13.7 \pm 3.5$  % of the peak  $Ca^{2+}$  current of  $204.3 \pm 5.6$  pA ( $n = 7$ ) and  $29.3 \pm 3.2$  pA equivalent to  $15.4 \pm 1.7$  % of the peak  $Ca^{2+}$  current of  $190.0 \pm 5.6$  pA ( $n = 17$ );  $p = 0.1$  unpaired t-test). The amplitude of the exocytotic responses were also found of similar amplitudes,  $27 \pm 2.7$  fF and  $31.9 \pm 1.9$  fF in gerbil and mouse IHCs respectively (Fig. 2C-2D;  $p = 0.1$  unpaired t-test). Notably,  $I_{CaTB}$  was abolished in gerbil and mouse IHCs when adding to the external solution 10 mM of the strong pH buffer HEPES (Fig. 2, green lines), while the exocytotic amplitude remained unchanged

( $p = 0.5$ ), indicating that it was produced by  $H^+$  release. Notably, in bicarbonate solution,  $I_{CaTB}$  consisted in a first large notch followed by smaller notches in the trace of the  $Ca^{2+}$  current ( $9.6 \pm 0.4$  pA,  $n = 47$  events, 9 IHCs, Fig. S1A and Fig. 6D, black trace inset). The extracellular HEPES solution abolished both the first large notch (likely corresponding to the effect of synchronous events) and the small asynchronous notches (Fig. 2 and Fig. S1A).

### Voltage-dependence of $I_{CaTB}$ and its correlation with exocytosis in mouse post-hearing IHCs

The amplitude of  $I_{CaTB}$ , when stepping mouse IHCs from  $-80$  mV to  $-10$  mV for 100 ms, displayed a linear correlation with both  $Ca^{2+}$  current and exocytotic amplitudes (Fig. 3A-D). A significant  $I_{CaTB}$  could be measured at potentials as low as  $-45$  mV and its amplitude peaked at nearly  $-20$  mV, a voltage close to the peak of the  $Ca^{2+}$  currents. Expressed in % of  $Ca^{2+}$  current,  $I_{CaTB}$  was more effective at negative potentials and decreased linearly from  $30.2 \pm 0.9$  % ( $-45$  mV) to  $15.1 \pm 1.3$  % ( $-10$  mV) (Fig. 3F). The width of  $I_{CaTB}$ , which can be interpreted as a reverse indicator of  $H^+$  release synchronization, increased with depolarization and peaked nearly  $-20$  mV at the maximum voltage activation of  $Ca^{2+}$  currents (Fig. 3E). When switching the intracellular  $Ca^{2+}$  buffer from 1mM EGTA to 5 mM BAPTA, post-hearing mouse IHCs displayed largely reduced exocytotic responses ( $9.1 \pm 2.1$  fF,  $n = 6$ ;  $p < 0.05$  unpaired t-test) and did longer display significant synchronous  $I_{CaTB}$  while  $Ca^{2+}$  currents were unchanged (Fig. 4A-4D). Notably, in 5 mM BAPTA, the small  $I_{CaTB}$  events, normally following the first large notch in EGTA conditions, were preserved ( $8.2 \pm 0.4$  pA, mean of 34 events on 6 IHCs, Fig. S1B;  $p = 0.02$ ).

### $I_{CaTB}$ is absent in otoferlin-lacking IHCs and in pre-hearing IHCs

Post-hearing (P14-P18) mouse IHCs lacking otoferlin (*Otof*<sup>-/-</sup> IHCs), having normal  $Ca^{2+}$  currents but largely reduced exocytosis (Roux *et al.*, 2006; Vincent *et al.*, 2014), displayed largely reduced synchronous first  $I_{CaTB}$  events (Fig. 4B, 4D, 4E and Fig. S1C). However, small asynchronous notches in the  $Ca^{2+}$  current were still visible during depolarization (mean amplitude of  $5.7 \pm 0.2$  pA corresponding to  $3.6 \pm 0.1$  % of the peak  $Ca^{2+}$  current, mean of 41 events on 8 IHCs,  $p < 0.05$  as compared to control; Fig. 6D, inset red trace, Fig. S1C). These small notches were not seen in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs bathing in an extracellular medium with 10 mM HEPES, suggesting that they arise from a  $H^+$  effect on  $Ca^{2+}$  current (Fig. S1C).

The amplitude of the first  $I_{CaTB}$  (synchronous) events following the  $Ca^{2+}$  current onset in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs did not correlate with exocytosis on the contrary to what observed in control IHCs (Fig. 4E). The various level of exocytosis and the corresponding first  $I_{CaTB}$  events were measured during a train of depolarization where a significant depression of exocytosis occurs (100 ms steps from  $-80$  mV to  $-10$  mV separated by 100ms, as shown in Fig. 6C). Notably, at comparable low exocytotic level (in controls and in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs:  $9.6 \pm 0.7$  fF and  $8.3 \pm 0.72$  fF, respectively;  $p = 0.23$  unpaired t-test), control IHCs showed significant larger synchronous  $I_{CaTB}$  (Fig. 4F;  $7.7 \pm 0.6$  % ( $13.7 \pm 1.25$  pA,  $n = 17$ ) and  $1.9 \pm 0.5$  % ( $3.2 \pm 0.2$  pA,  $n = 10$ ) in control and *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs respectively,  $p < 0.05$  unpaired t-test). Similar difference was observed in control IHCs recorded with 5 mM intracellular BAPTA, where the small residual amount of exocytosis produced largely reduced synchronous  $I_{CaTB}$  (Fig. 4A, 4D;  $15.4 \pm 1.7$  % ( $29.3 \pm 3.2$  pA,  $n = 17$ ) and  $3.5 \pm 0.6$  % ( $7.0 \pm 1.5$  pA,  $n = 12$ ) in control and 5 mM BAPTA conditions respectively,  $p < 0.05$  unpaired t-test). These results suggested that the lack of otoferlin, similarly to intracellular BAPTA, desynchronized  $H^+$  release.

We then investigated  $I_{CaTB}$  in immature pre-hearing IHCs (P6-P9 IHCs) in which exocytosis is known to have a lower  $Ca^{2+}$  efficiency and a higher  $Ca^{2+}$  threshold, presumably due to a loose spatial organization between  $Ca^{2+}$  channels and the sites of release at the ribbon (Johnson *et al.* 2005; Beurg *et al.*, 2010). For a 100ms voltage-step depolarization from  $-80$

mV to -10 mV, although  $\text{Ca}^{2+}$  currents of pre-hearing IHCs were twice larger than post-hearing IHCs ( $334.1 \pm 26.9$  pA,  $n = 8$ , and  $190.0 \pm 5.6$  pA,  $n = 17$ ) in pre and post-hearing IHCs respectively,  $p < 0.05$  unpaired t-test), they generated comparable exocytotic responses ( $28.5 \pm 3.5$  fF,  $n = 14$ , as compared to  $31.9 \pm 1.9$  fF in post-hearing IHCs ( $n = 17$ ),  $p = 0.6$  unpaired t-test) but with largely reduced  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  events ( $2.1 \pm 0.2$  pA,  $n = 14$ ,  $p < 0.05$ ; Fig. 4C, 4D). Notably,  $\text{Ca}^{2+}$  currents of pre-hearing IHCs showed larger inactivation than post-hearing IHCs ( $125.1 \pm 17.5$  pA as compared  $46.63 \pm 8.83$  pA for a 100 ms step from -80 mV to -10 mV, respectively). This larger inactivation was likely due to a larger  $\text{Ca}^{2+}$  dependent inactivation rather than a block by exocytosed  $\text{H}^+$  since it was still observed in extracellular HEPES conditions. The absence of the synchronous large  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  in immature IHCs was likely due to the fact that  $\text{Ca}^{2+}$  channels and the sites of release are not yet organized in nanodomains.

### The $\text{Ca}^{2+}$ -dependence of $\text{I}_{\text{CaTB}}$ in post-hearing mouse IHCs

To test the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of  $\text{I}_{\text{CaTB}}$ , we recorded  $\text{Ca}^{2+}$  currents and exocytosis when varying the concentration of external  $\text{Ca}^{2+}$  from 0.5 to 10 mM at constant voltage step-depolarization from -80 mV to -10 mV (Fig. 5). In these conditions, the peak amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  currents increased linearly with the concentration of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  from  $107.6 \pm 9.1$  pA at 0.5 mM to  $237.8 \pm 10.5$  pA at 10 mM with a slope of  $14.2 \pm 3.5$  pA/mM (Fig 5A, 5B). However,  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  current amplitudes displayed a nonlinear relationship that was best fitted with a power function of index 3 (Fig. 5C). A similar non linear relationship was found between the integral of  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  and the  $\text{Ca}^{2+}$  currents (Fig. 5D). The amplitude of  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  was similarly found to have a nonlinear relationship with exocytosis (Fig. 5F). This nonlinear  $\text{Ca}^{2+}$ -dependence of  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  and exocytosis, when varying the flux of  $\text{Ca}^{2+}$ , likely reflected the cooperativity of the putative exocytotic  $\text{Ca}^{2+}$  sensor otoferlin. Such a cooperative super linear relationship was also described between the pre-synaptic  $\text{Ca}^{2+}$  flux and the EPSC amplitudes (Goutman and Glowatski, 2007). Remarkably, we found that the time to peak of the first synchronous  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  decreased exponentially with the amplitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  currents, suggesting that synchronous release was  $\text{Ca}^{2+}$  dependant (Fig. 5E).

### $\text{I}_{\text{CaTB}}$ as an indicator of multivesicular release

Exocytosis and  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  (first notch) displayed a similar paired-pulse depression when applying two consecutive stimulations of 100 ms separated by 100 ms (Fig. 6A-6B;  $39.7 \pm 5.9$  % and  $46.6 \pm 5.1$  %, respectively,  $p = 0.38$ ). Similar effects were observed during a train of stimulations where the depression of exocytosis progressively affected the amplitude of  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  (Fig. 6C). These results constituted an additional argument in favor of  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  being triggered during exocytosis. The amplitude of these various  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  was linearly correlated with exocytosis (Fig. 4E). Their width (duration) showed a linear relationship with their peak amplitudes (Pearson's  $r = 0.8$ ; Fig. 6E), again suggesting that large  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  events had a reduced temporal synchronization. Furthermore, the amplitude distribution of these different first  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  events, measured during a train of depolarization, clearly showed 4 peaks at 12.7, 22.2, 33.9 and 51.6 pA. In *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs, only small notches in the  $\text{Ca}^{2+}$  currents averaging 5.7 pA could be measured during stimulation (Fig. 4E-4F and Fig. 6D, inset). Considering that these small notches in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs are the results of desynchronized release, i.e represent unique events, the different peak amplitudes of  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  in WT-IHCs were estimated to correspond to the synchronization of 2, 4, 6 and 9 release events. These results suggested that  $\text{H}^+$  release involved a multivesicular process, with large  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  events likely resulting from the fusion of a large number vesicles at the expense of a somewhat degraded synchronization as compared to small  $\text{I}_{\text{CaTB}}$ s likely involving a lower number of vesicles (Fig. 6E and Fig. 3E).

When we plotted the amplitude of the  $I_{CaTB}$  events measured over time during a 100 ms depolarization from -80 mV to -10 mV, we found a strong  $Ca^{2+}$  dependence in the amplitude of the first large  $I_{CaTB}$  (synchronous) events measured immediately after the peak of the  $Ca^{2+}$  current (Fig. 7A). Remarkably, the amplitude of the following asynchronous small events was found to be  $Ca^{2+}$  independent, in agreement to what has been shown for the amplitude of the EPSCs (Goutman and Glowatzki, 2010). In *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs, no synchronous  $I_{CaTB}$  events could be observed while asynchronous small events were present but significantly reduced as compared to controls ( $5.7 \pm 0.2$  pA as compared to  $9.6 \pm 0.4$  pA, in controls; Fig. 7B;  $p < 0.05$ ). This remaining small asynchronous  $I_{CaTB}$  events in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs could possibly explained the remaining normal spontaneous EPSC events recorded in vestibular type I hair cells (Dulon *et al.*, 2009) and IHCs lacking otoferlin (Beurg *et al.*, 2010)

### Fast transient adaptation in the firing discharge rate of the mouse auditory nerve fibers

To search whether the transient block of  $Ca^{2+}$  currents in IHCs could leave a signature on the firing discharge pattern of the auditory nerve fibers (ANF), we analyzed in detail the sound-evoked discharge properties of a large number of ANF from 2-3 months old mice. PST histograms, measured at characteristic frequency (CF) and 30 dB above threshold (with a binning of 0.5ms) as previously described (Taberner and Liberman, 2005), typically showed a fast rise in discharge rate at tone-burst onset. The first spike latency (FSL) averaged  $2.76 \pm 0.06$  ms (not corrected for the acoustic delay) and the coefficient of variation of interspike intervals (CV) was  $0.63 \pm 0.01$  ( $n = 44$  ANF). These values of FSL and CV fell well into the criteria for distinguishing ANF from cochlear nucleus units (Young *et al.*, 1988; Taberner *et al.*, 2005). The peak rate of the PST histograms averaged  $862 \pm 37$  spikes/s ( $n=44$ ) and decayed within ms to a mean steady-state value of  $232 \pm 7.5$  spikes/s (Fig. 7A). This decay or adaptation of the firing rate could be fitted with two time constants of  $0.6 \pm 0.3$  ms and  $5.7 \pm 0.6$  ms. Remarkably, during the first ms of adaptation, a notch corresponding to a fast transient cessation of firing was observed in 33 out of the 44 recorded ANF (Fig. 7A). The notch in the ANF firing was indifferently observed in C57BL/6J and Sv/129 mice (8/10 and 25/34 ANF, respectively). The mean amplitude of the notch corresponded to a transient rebound in firing rate of  $160 \pm 11$  spikes/s lasting 1 to 2 ms. The fast transient block produced a mean drop of 655 spikes/s from the peak discharge rate, i.e. a reduction of  $76 \pm 3.5$  % of the maximum firing rate;  $n=33$ ). This notch was indifferently observed in fibers with low and high spontaneous rate (SR) (Fig. 7A, 7B). In ANF with  $SR < 5$ ,  $5 < SR < 50$  and  $SR > 50$  spike/s, the notch was observed in 7/12, 3/24 and 8/8 PST histograms, respectively. The notch was also indifferently observed in low frequency and high frequency coding ANF:  $CF < 10$  kHz (2/4)  $10$  kHz  $< CF < 20$  kHz (11/14) and  $CF > 20$  kHz (20/26).

## DISCUSSION

### Fast H<sup>+</sup> block of Ca<sup>2+</sup> channels in IHCs of low and high-frequency hearing mammals

Our study shows for the first time that a fast H<sup>+</sup>-induced adaptation of Ca<sup>2+</sup> currents (I<sub>CaTB</sub>) occurs during exocytosis in IHCs of gerbil and mouse IHCs. We found that I<sub>CaTB</sub> had similar kinetics and amplitude in the two types of mammalian IHCs. Since IHCs recordings were obtained from the apical coil of the cochlea corresponding to a frequency coding region spanning from 0.5 to 1 kHz in the gerbil and 8 to 16 kHz in the mouse, our results showed that I<sub>CaTB</sub> occurs in both low frequency coding IHCs with ANFs displaying phase locking (Versteegh *et al.*, 2011) and high frequency coding mouse IHCs with ANFs showing poor phase locking (Taberner and Liberman, 2005). Since similar proton regulation of Ca<sup>2+</sup> currents was also described in the low-frequency amphibious hearing hair cells (Cho and von Gersdorff, 2014), this regulation appears as a general characteristic of auditory hair cells. This fast I<sub>CaTB</sub> could in part explain the fast adaptation of the discharge rate of the auditory nerve fibers.

### I<sub>CaTB</sub> as a candidate mechanism underlying the fast firing adaption of the auditory nerve fibers

As previously described (Westerman and Smith, 1984; Buran *et al.*, 2010), mouse ANF fibers respond to tone burst with a fast increase in their spike rate at stimulus onset that rapidly declines exponentially within few ms. In our study, this adaptation showed a two phase exponential decay with  $\tau \sim 0.6$  and 6 ms, as previously shown (Buran *et al.*, 2010). Remarkably, the first phase of adaptation showed a notch in about 70% of the ANFs. This notch corresponded to a fast and transient reduction of firing immediately following the onset-peak of firing. A similar firing adaptation with notch was recorded from the auditory nerve root (ANFs) and from the pri-N neurons of the ventral cochlear nucleus (VCN) of the cat (Young *et al.*, 1988). These VCN neurons, likely corresponded to the bushy cells that receive large synapses from the ANFs and in turn directly inherit their firing irregularity and notch adaptation from them (Young *et al.*, 1988). In this latter study, the notch was observed in PST histograms computed with small bins of 0.1 or 0.2 ms. The fact that the notch was not systematically observed in our study suggested that during our 0.5 ms-binning period we may have missed the brief notch in some of the PST histograms. Several possible origins can explain the fast firing adaptation of the ANFs: 1) the refractoriness of the auditory fibers but this factor has been suggested to be constant and independent of the discharge rate (Li and Young, 1993), 2) the desensitization of the postsynaptic AMPA receptors but the fast depression of the auditory fiber activity is insensitive to cyclothiazide, an agent that removes AMPA desensitization (Goutman and Glowatzki, 2007), 3) the mechano-electrical adaptation at the hair bundles but the IHC receptor potential does not show fast adaptation (Russel and Sellick 1978; Palmer and Russel, 1986), 4) the fast depletion of the readily releasable pool (RRP) of synaptic vesicles from the ribbons (Furukawa and Matsuura, 1978; Moser and Beutner, 2000; Buran *et al.*, 2010). A fast RRP depletion is believed to be the main factor adapting the firing rate of the ANFs. Inactivation of pre-synaptic Ca<sup>2+</sup> currents has been generally excluded as a major source of the ANF firing adaptation presumably because their Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation has a small amplitude and slow kinetics (Grant and Fuchs, 2008; Johnson and Marcotti, 2008; Joiner and Lee, 2015). Based on our results, we propose that part of the fast adaptation of ANFs could arise from a fast pre-synaptic I<sub>CaTB</sub> that possibly explains the notch seen in the PST histograms. Although the kinetics and amplitude of the transient block observed in the ANF PST histograms *in vivo* were much larger than the one measured for I<sub>CaTB</sub> in IHCs *in vitro* (0.6 ms vs 2.28 ms and 70 % block vs 15 %, respectively), these differences could possibly be explained by a better synchronization of



H<sup>+</sup> release *in vivo* at 37°C that would more efficiently block Ca<sup>2+</sup> currents. The timing and strength of transmitter release is well known to be strongly dependent on temperature (Kushmerick *et al.*, 2006).

### Otoferlin-dependant multivesicular release

In bullfrog auditory hair cells, a high intracellular concentration of the fast Ca<sup>2+</sup> chelator BAPTA was here found to largely desynchronize the post-synaptic events, as previously described in mouse IHCs (Goutman and Glowatzki, 2007). This BAPTA effect was also found to largely reduced I<sub>CaTB</sub> both in bullfrog and mouse IHCs, suggesting that I<sub>CaTB</sub> involves a highly synchronized release of several synaptic vesicles. Interestingly, following the first fast large I<sub>CaTB</sub> event that occurs right after the depolarization onset, we noticed small I<sub>CaTB</sub> events during the sustained depolarization in mouse hair cells. A similar pattern was previously reported in the EPSC events of mouse (Goutman and Glowatzki, 2007) and bullfrog auditory synapses (Keen and Hudspeth, 2006; Li *et al.*, 2009). Remarkably, we found that the amplitude of the first large I<sub>CaTB</sub> event, that likely corresponded to synchronous release, showed a strong Ca<sup>2+</sup> dependence. On the contrary, the following small I<sub>CaTB</sub> events (asynchronous release) showed a constant amplitude when varying the Ca<sup>2+</sup> influx. Similarly, the occurrence of the first large synchronized EPSCs was also found to be Ca<sup>2+</sup> dependent (suppressed by BAPTA) while the amplitudes of the steady-state EPSCs, measured in the last 100 ms of stimulation, were reported to be Ca<sup>2+</sup> independent (Goutman and Glowatzki, 2007). A Ca<sup>2+</sup> dependence of the EPSC amplitude was also observed in bullfrog hair cell synapses (Li *et al.*, 2009).

How many sites of vesicular release per ribbon synapses? Each synaptic ribbon active zone of IHC has been estimated to involve a maximum of about 20 open Ca<sup>2+</sup> channels (Brand *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2014). This would then constitute seven potential sites of release per ribbon if each release sites is composed of 3 Ca<sup>2+</sup> channels. This implicates that a maximum of seven 40 nm wide vesicles could possibly fuse simultaneously at each ribbon, a number that fit well the space limit of the 250 nm wide active zone at each ribbon. Therefore, the large dynamic range of the I<sub>CaTB</sub> events could be explained by a Ca<sup>2+</sup> dependent synchronization of the seven different sites of release at each ribbon (MVR). However, the release of a single vesicle, having a pore of varying size (UVR; Chapochnikov *et al.*, 2014), could alternatively explained I<sub>CaTB</sub>. Indeed, the flicker capacitance up-step size distribution reflecting single vesicle fusion at the calyx of Held was demonstrated to greatly vary from 20 to nearly 200 aF (He *et al.*, 2006). However, a strong argument in favor of MVR comes from our observation that the width of the I<sub>CaTB</sub> events becomes larger when their amplitude increased with depolarization (Fig. 6E), i.e. synchronization seems to decrease at large events. In the case of a fusion pore modulation with fast flickering states (He *et al.*, 2006), we believe that the width (synchronicity) of I<sub>CaTB</sub> events would have on the contrary decrease while their amplitude increase. In IHCs lacking otoferlin, the first large synchronous I<sub>CaTB</sub> was abolished but the smaller small asynchronous I<sub>CaTB</sub> persisted, although their mean size were about twice smaller than in wild-type IHCs. In a MVR scenario, assuming that the asynchronous I<sub>CaTB</sub> events in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs represent the fusion of a single vesicle, the multi-peak Gaussian distribution of the I<sub>CaTB</sub> events possibly corresponded to the simultaneous fusion of 2 to 9 vesicles. Remarkably, this number of vesicles fitted well with the estimated number of sites of release per ribbon, i.e a maximum of seven vesicles possibly fusing simultaneously as indicated above. The abolition of the first synchronous I<sub>CaTB</sub> events in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs suggested that otoferlin functions as a Ca<sup>2+</sup> sensor that synchronizes the fusion of these 7 to 9 sites of release present at each ribbon. Furthermore, the reduction in amplitude of the asynchronous events in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs also suggested a Ca<sup>2+</sup>-independent regulation of vesicular release by otoferlin.

**REFERENCES**

- Beurg M, Michalski N, Safieddine S, Bouleau Y, Schneggenburger R, Chapman ER, Petit C, Dulon D (2010) Control of Exocytosis by Synaptotagmins and Otoferlin in Auditory Hair Cells. *Journal of Neuroscience* 30:13281-13290.
- Brandt A, Khimich D, Moser T (2005) Few Ca(V)1.3 channels regulate the exocytosis of a synaptic vesicle at the hair cell ribbon synapse. *Journal of Neuroscience* 25:11577-11585.
- Buran BN, Strenzke N, Neef A, Gundelfinger ED, Moser T, Liberman MC (2010) Onset coding is degraded in auditory nerve fibers from mutant mice lacking synaptic ribbons. *J Neurosci* 30:7587-7597.
- Chapochnikov NM, Takago H, Huang CH, Pangrsic T, Khimich D, Neef J, Auge E, Gottfert F, Hell SW, Wichmann C, Wolf F, Moser T (2014) Uniquantal release through a dynamic fusion pore is a candidate mechanism of hair cell exocytosis. *Neuron* 83:1389-1403.
- Cho S, von Gersdorff H (2014) Proton-mediated block of Ca<sup>2+</sup> channels during multivesicular release regulates short-term plasticity at an auditory hair cell synapse. *J Neurosci* 34:15877-15887.
- Crawford AC, Fettpiece R (1980) The frequency selectivity of auditory nerve fibers and hair cells in the cochlea of the turtle. *J Physiol* 306:79-125.
- DeVries SH (2001) Exocytosed protons feedback to suppress the Ca<sup>2+</sup> current in mammalian cone photoreceptors. *Neuron* 32:1107-1117.
- Dulon D, Safieddine S, Jones SM, Petit C (2009) Otoferlin Is Critical for a Highly Sensitive and Linear Calcium-Dependent Exocytosis at Vestibular Hair Cell Ribbon Synapses. *J Neurosci* 29:10474-10487.
- Furukawa T, Matsuura S (1978) Adaptive rundown of excitatory post-synaptic potentials at synapses between hair cells and eight nerve fibres in the goldfish. *J Physiol* 276:193-209.
- Gillis KD (2000) Admittance-based measurement of membrane capacitance using the EPC-9 patch-clamp amplifier. *Pflügers Arch* 439:655-664.
- Glowatzki E, Fuchs PA (2002) Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci* 5:147-154.
- Goutman JD, Glowatzki E (2007) Time course and calcium dependence of transmitter release at a single ribbon synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:16341-16346.
- Grant L, Fuchs P (2008) Calcium- and calmodulin-dependent inactivation of calcium channels in inner hair cells of the rat cochlea. *J Neurophysiol* 99:2183-2193.
- Graydon CW, Cho S, Li GL, Kachar B, von Gersdorff H (2011) Sharp Ca(2+)-nanodomains beneath the ribbon promote highly synchronous multivesicular release at hair cell synapses. *J Neurosci* 31:16637-16650.

- He L, Wu XS, Mohan R, Wu LG (2006) Two modes of fusion pore opening revealed by cell-attached recordings at a synapse. *Nature* 444:102–105.
- Johnson SL, Marcotti W (2008) Biophysical properties of CaV1.3 calcium channels in gerbil inner hair cells. *J Physiol* 586:1029-1042.
- Johnson SL, Marcotti W, Kros CJ (2005) Increase in efficiency and reduction in Ca<sup>2+</sup> dependence of exocytosis during development of mouse inner hair cells. *Journal of Physiology-London* 563:177-191.
- Joiner ML, Lee A (2015) Voltage-Gated Cav1 Channels in Disorders of Vision and Hearing. *Curr Mol Pharmacol* 8:143-148.
- Keen EC, Hudspeth AJ (2006) Transfer characteristics of the hair cell's afferent synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:5537-5542.
- Kushmerick C, Renden R, von Gersdorff H (2006) Physiological temperatures reduce the rate of vesicle pool depletion and short-term depression via an acceleration of vesicle recruitment. *J Neurosci* 26:1366-1377.
- Moser T, Beutner D (2000) Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:883-888.
- Li G, Keen E, Andor-Ardo D, Hudspeth AJ, von Gersdorff H (2009) The unitary event underlying multiquantal EPSCs at a hair cell's ribbon synapse. *J Neurosci* 29:7558-7568.
- Lindau M, Neher E (1988) Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflügers Arch* 411:137-146.
- Palmer AR, Russell IJ (1986) Phase-locking in the cochlear nerve of the guinea-pig and its relation to the receptor potential of inner hair-cells. *Hearing Res* 24:1-15.
- Palmer MJ, Hull C, Vigh J, von Gersdorff H (2003) Synaptic cleft acidification and modulation of short-term depression by exocytosed protons in retinal bipolar cells. *J Neurosci* 23:11332-11341.
- Pitchford S, Ashmore JF (1987) An electrical resonance in hair cells of the amphibian papilla of the frog *Rana temporaria*. *Hear Res* 27:75–83.
- Roux I, Safieddine S, Nouvian R, Grati M, Simmler MC, Bahloul I, 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.
- Russell IJ, Sellick PM (1978) Intracellular studies of hair cells in the mammalian cochlea. *J Physiol* 284:261-290.
- Taberner AM, Liberman, MC (2005) Response Properties of Single Auditory Nerve Fibers in the Mouse. *J Neurophysiol* 93:557–569.

Versteegh CP, Meenderink, SW, Van Der Heijden, M (2011) Response characteristics in the apex of the gerbil cochlea studied through auditory nerve recordings. *J Assoc Res Otolaryngol* 12:301-16.

Vincent PF, Bouleau Y, Safieddine S, Petit C, Dulon D (2014) Exocytotic machineries of vestibular type I and cochlear ribbon synapses display similar intrinsic otoferlin-dependent Ca<sup>2+</sup> sensitivity but a different coupling to Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurosci* 34:10853-10869.

Young ED, Robert JM, Shofner WP (1988) Regularity and latency of units in ventral cochlear nucleus: implications for unit classification and generation of response properties. *J Neurophysiol* 60:1-29.

Westerman LA, Smith RL (1984) Rapid and short-term adaptation in auditory nerve responses. *Hear Res* 15:249-260.

## LEGENDS

**Figure 1: Transient block of presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  currents ( $I_{\text{CaTB}}$ ) correlates with transmitter release: Its sensitivity to intracellular BAPTA**

**A1)** Representative trace of paired whole-cell voltage-clamp recordings of presynaptic hair cell and a postsynaptic afferent fiber. The hair cell was depolarized from -60 mV to -30 mV for 20 ms after 10 seconds (black), 3 minutes (green) and 5 minutes (red) after the whole-cell break-in. Intercellular pipette solution of hair cells included 10 mM BAPTA. The multiquantal EPSC had a large amplitude that correlates with the proton inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$  currents. As 10 mM BAPTA dialyzed into the hair cell, the EPSC was decreased and the proton effect on the  $\text{Ca}^{2+}$  current was removed (red trace) in contrast with that of the early recordings obtained 10 seconds after the break-in (black).

**A2)** An expanded time scale of A1 shows that 10 mM BAPTA delays the first EPSC event and strongly decreases the amplitude.

**B.** The average EPSC charge of the later recordings (> 4 minutes after the break-in,  $2.0 \pm 0.7$  pC) was significantly decreased in comparison with the initial recordings (< 1 minute after the break-in,  $16.8 \pm 4.5$  pC,  $n = 7$  pairs,  $p < 0.01$ , paired t test).

**C)** The ratio of transient block (%) of the  $\text{Ca}^{2+}$  current was measured from the amplitude of transient block (b) divided by the amplitude of peak  $\text{Ca}^{2+}$  current (a). 10 mM BAPTA significantly decreased the transient block from  $30.5 \pm 5.3$  % in the initial recordings (< 1 minute after the break-in, black,  $n = 7$ ) to 0 in the later recordings (> 4 minutes after the break-in, red,  $n = 7$ ,  $p < 0.01$ , paired t test).

**Figure 2:  $I_{\text{CaTB}}$  in post-hearing gerbil and mouse auditory inner hair cells**

**(A-B)** Simultaneous recordings of  $\text{Ca}^{2+}$  currents ( $I_{\text{Ca}}$ ) and capacitance jump ( $\Delta C_m$ ) in a P30-gerbil IHC (A, dark brown trace) and a P17-mice IHCs (B, black trace) in the presence of 25 mM bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) as a weak  $\text{H}^+$  buffer in the extracellular solution. Green traces show examples of recordings in gerbil and mouse IHCs at the same age that lack  $I_{\text{CaTB}}$  when 10 mM of the strong pH buffer HEPES was added to the extracellular  $\text{HCO}_3^-$  solution. Cells were depolarized from -80 mV (resting potential) to -10 mV for 100 ms (top). Insets show the method used to determine the percentage of  $I_{\text{CaTB}}$  (A, inset) and its onset kinetics (B, inset).

**(C-D)** The histograms display the mean  $\pm$  SEM of  $\Delta C_m$ ,  $I_{\text{CaTB}}$  amplitudes and activation time constants, measured in gerbil and mouse IHCs in presence of 25 mM  $\text{HCO}_3^-$  alone or with the additional 10 mM HEPES in the extracellular solution. Values of  $I_{\text{CaTB}}$  in presence of HEPES were in the range of the signal noise (5 pA). Note that  $\Delta C_m$  and  $I_{\text{CaTB}}$  values of the two mammalian species fall within a similar range.

**Figure 3: Voltage dependence of  $I_{\text{CaTB}}$  in post-hearing IHCs: its linear correlation with  $\text{Ca}^{2+}$  current and exocytosis amplitudes.**

Cells were step depolarized from -90 mV to -10 mV for 100 ms in 5 mV increment.

**(A)**  $\text{Ca}^{2+}$  currents and  $I_{\text{CaTB}}$  were plotted against voltage from -55 to -10 mV. Inset in A shows the method used to measure the amplitude of the transient block. Inset in B shows the voltage protocol. **(B)** Exocytosis and  $I_{\text{CaTB}}$  measured in the same IHCs were plotted against voltage.

**(C-D)**  $I_{\text{CaTB}}$  against  $\text{Ca}^{2+}$  currents (C) or exocytosis (D) displayed a linear relationship with a mean slope of  $0.17 \pm 0.03$   $I_{\text{CaTB}}$  pA/  $I_{\text{Ca}}$  pA and  $0.11 \pm 0.03$  pA/fF, respectively.

(E) Variation of the width of  $I_{CaTB}$  against voltage suggested a better synchronization of  $H^+$  release at low voltage near resting membrane potential. Data were fit with a parabolic function.

(F)  $I_{CaTB}$  (in percent of total  $I_{Ca}$ ) linearly decreases with voltage-depolarization, indicating that the inhibitory effect of the exocytosed  $H^+$  is more effective near resting membrane potential. Data were fit with a linear function with a slope of  $-0.69 \pm 0.13 I_{CaTB} \% /mV$ .

Insets in E and F show the method used to measure the width and the percentage of the transient block, respectively.

#### Figure 4: $I_{CaTB}$ correlates with otoferlin-dependant exocytosis in post-hearing mouse IHCs.

Cells were step depolarized from -80 mV to -10 mV for 100 ms.

(A and D)  $I_{CaTB}$  was strongly reduced to noise level when 5 mM of the fast  $Ca^{2+}$  buffer BAPTA was present in the intracellular recording solution. Exocytosis was also largely reduced (blue). The surimposed transparent grey trace shows  $I_{CaTB}$  recorded with 1mM intracellular EGTA as  $Ca^{2+}$  buffer in 25 mM external  $HCO_3^-$ .

(B and D) Exocytosis and  $I_{CaTB}$  were strongly reduced in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (red). The surimposed transparent grey trace shows  $I_{CaTB}$  recorded from a P17-WT-IHC in 1mM intracellular EGTA and in 25 mM external  $HCO_3^-$ .

(C and D) While showing large exocytotic responses, immature P7-IHCs do not display significant  $I_{CaTB}$  (orange). The surimposed light orange trace shows an example of recording in a P7-IHC in 10 mM external HEPES. Note that the fast inactivation of the immature  $I_{Ca}$  currents was similar in both conditions indicating that it was not related to  $H^+$  block.

(D) Histogram of  $I_{CaTB}$  and  $\Delta C_m$  in the different conditions. Colors are the same as A-C. Results are Mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

(E) Plot of the  $\Delta C_m$  responses against  $I_{CaTB}$  shows a good Pearson's correlation of 0.71 with a  $R^2$  of 0.54 in WT-IHCs (black points) but not in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs.

(F) A magnification of E shows that, although having a low level of exocytosis, *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs failed to trigger significant  $I_{CaTB}$  as compared to WT-IHCs at similar exocytotic amplitudes. These data suggested that otoferlin is essential for an efficient synchronization of vesicular  $H^+$  release near  $Ca^{2+}$  channels.

#### Figure 5: The $Ca^{2+}$ dependence of $I_{CaTB}$ when varying the concentration of extracellular $Ca^{2+}$

(A) Post-hearing mouse IHCs were perfused with the low pH buffering solution  $HCO_3^-$  containing 0.5 (light grey), 1.3 (grey), 5 (dark grey) or 10 mM (black) extracellular  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_e$ ).  $Ca^{2+}$  currents (top) and  $\Delta C_m$  responses (bottom) were recorded during a 100 ms constant voltage-step from -80 to -10 mV. Inset indicates how maximum amplitude of the  $Ca^{2+}$  current ( $I_{Ca} \max$ ), the amplitude of  $I_{CaTB}$  and the time to peak of  $I_{Ca}$  were analyzed.

(B) The peak amplitude of  $Ca^{2+}$  currents linearly increased with  $[Ca^{2+}]_e$ .

(C-D) Amplitudes and  $Q_{Ca}$ -integral of  $I_{CaTB}$  were plotted against  $I_{Ca}$ . Inset in D displays the  $Q_{Ca}$  integral of  $I_{CaTB}$  in red. Data were best fitted with a nonlinear power function with power index 3, suggesting that  $I_{CaTB}$  directly reflected the cooperativity of  $Ca^{2+}$  binding to the  $Ca^{2+}$  sensor when varying the  $Ca^{2+}$  flux at constant voltage.

(E) The time to peak of  $I_{Ca}$  decreases exponentially when  $Ca^{2+}$  flux increased. These results suggested that  $I_{CaTB}$  slows down more efficiently the activation kinetics of  $Ca^{2+}$  currents, likely due to higher synchronization of  $H^+$  release, when  $Ca^{2+}$  inflow is small.

(F)  $\Delta C_m$  responses against  $I_{Ca}$  were also best fitted with a nonlinear power function with power index 3, again reflecting the  $Ca^{2+}$  cooperativity of the exocytotic sensor. Note that for B, C, D, E and F individual shade of grey points represent each cells and red points are the mean  $\pm$  SEM for each conditions.

**Figure 6:  $I_{CaTB}$  shows paired-pulse depression and is an indicator of multivesicular release.**

Post-hearing mouse IHCs were perfused with the low pH buffering solution  $HCO_3^-$ .

(A) Example of  $Ca^{2+}$  currents and  $\Delta C_m$  in response to a 100 ms paired-pulse stimulation from -80 to -10 mV, each step separated by a 100 ms interval. Note the simultaneous depression of  $I_{CaTB}$  and exocytosis at the second pulse.

(B) Histograms comparing the mean depression of  $I_{CaTB}$  and exocytosis during a paired-pulse stimulation as in A, P1 being the first pulse and P2 the second pulse. Note the similar coefficient of variation (CV) of  $I_{CaTB}$  and  $\Delta C_m$ . \*\*\*  $p < 0.001$

(C) Example of  $I_{CaTB}$  and exocytosis depression in response to a train of five 100 ms-stimulations from -80 to -10 mV, each step separated by 100 ms. Note the progressive and simultaneous decrease of  $I_{CaTB}$  and exocytosis.

(D) The initial large  $I_{CaTB}$  was often followed by several smaller notch events in the  $Ca^{2+}$  current (red arrow heads). (E) The amplitude of the various notch events recorded from 8 different IHCs increased linearly with their width, suggesting a process of multivesicular release where large  $I_{CaTB}$  reflects the synchronization of vesicular release.

(F) The amplitude distribution of the notch events both for *WT*- (black) and *Otof*<sup>-/-</sup>-IHCs (red) were fitted with a simple Gaussian. Assuming that the *Otof*<sup>-/-</sup>-events represents the fusion of a single vesicle (Univesicular release: UVR), we therefore estimated the number of vesicles per event in *WT*-IHCs (Multivesicular release: MVR). The number of vesicles is indicated above each peak.

**Figure 7: The amplitude of the synchronous  $I_{CaTB}$  events is  $Ca^{2+}$  and otoferlin-dependent**

(A) In *WT*-IHCs, the amplitudes of the various notches ( $I_{CaTB}$ ) were measured following the onset of the  $Ca^{2+}$  currents evoked by a 100 ms step depolarization from -80 to -10 mV and plotted over time (see the events in Fig. 6D, inset) when varying the extracellular  $Ca^{2+}$  concentrations (1.3, 5 and 10 mM; recordings from Fig.5).  $I_{CaTB}$  amplitudes declined exponentially over time ( $\tau=1.82 \pm 0.38$  ms) to a steady value near 10 pA. Note that the  $I_{CaTB}$  peak amplitudes increased with the concentration of extracellular  $Ca^{2+}$ , i.e  $Ca^{2+}$  influx. The peak values above 10 pA were considered as to correspond to highly synchronized release (yellow part) and the steady state values corresponding to asynchronous release.

(B) Variation of  $I_{CaTB}$  amplitude in *WT* and *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs as in A in the presence of 5 mM extracellular  $Ca^{2+}$  concentration. Note that the absence of large  $I_{CaTB}$  at the onset of the  $Ca^{2+}$  currents in *Otof*<sup>-/-</sup> IHC, suggesting that synchronous release was abolished. The steady small  $I_{CaTB}$  were also found smaller than the *WT*.

**Figure 8: The fast adaptation in the discharge rate of the mouse auditory nerve fibers displays a fast post-onset transient block or notch similar to  $I_{CaTB}$**

(A) Example of a PST histogram recorded from an AN fiber with the firing characteristics of a primary-like without notch (CF 17.95 kHz, SR 3.7 spike/s, FSL 2.6 ms and CV 0.64).

(B-C) Two examples of PST histograms with a notch, recorded from a low threshold AN fiber (CF 18 kHz, SR 64 spikes/s, threshold 25dB SPL, FSL 2.5ms; CV 0.71) and a high threshold AN fiber (CF 26 kHz, SR 14 spike/s, threshold 45 dB SPL, FSL 2.5 ms; CV 0.62). The 50 ms tone-burst was set at CF and 30 dB above threshold. Histogram bin was 0.5 ms.

(D) Mean  $\pm$  SEM PST histograms recorded from 16 ANF with CF ranging from 16 to 25 kHz. The inset, is an enlargement of the notch seen in the mean PST histogram shown in C. While the transient block displayed a decay time constant of  $0.6 \pm 0.3$  ms (black line), the firing reactivation kinetics (red line) could be fitted with an exponential with  $\tau = 1.2 \pm 0.12$  ms. The



second slow component of the adaptation (green line) could be fitted with an exponential decay with  $\tau = 5.7 \pm 0.6$  ms.

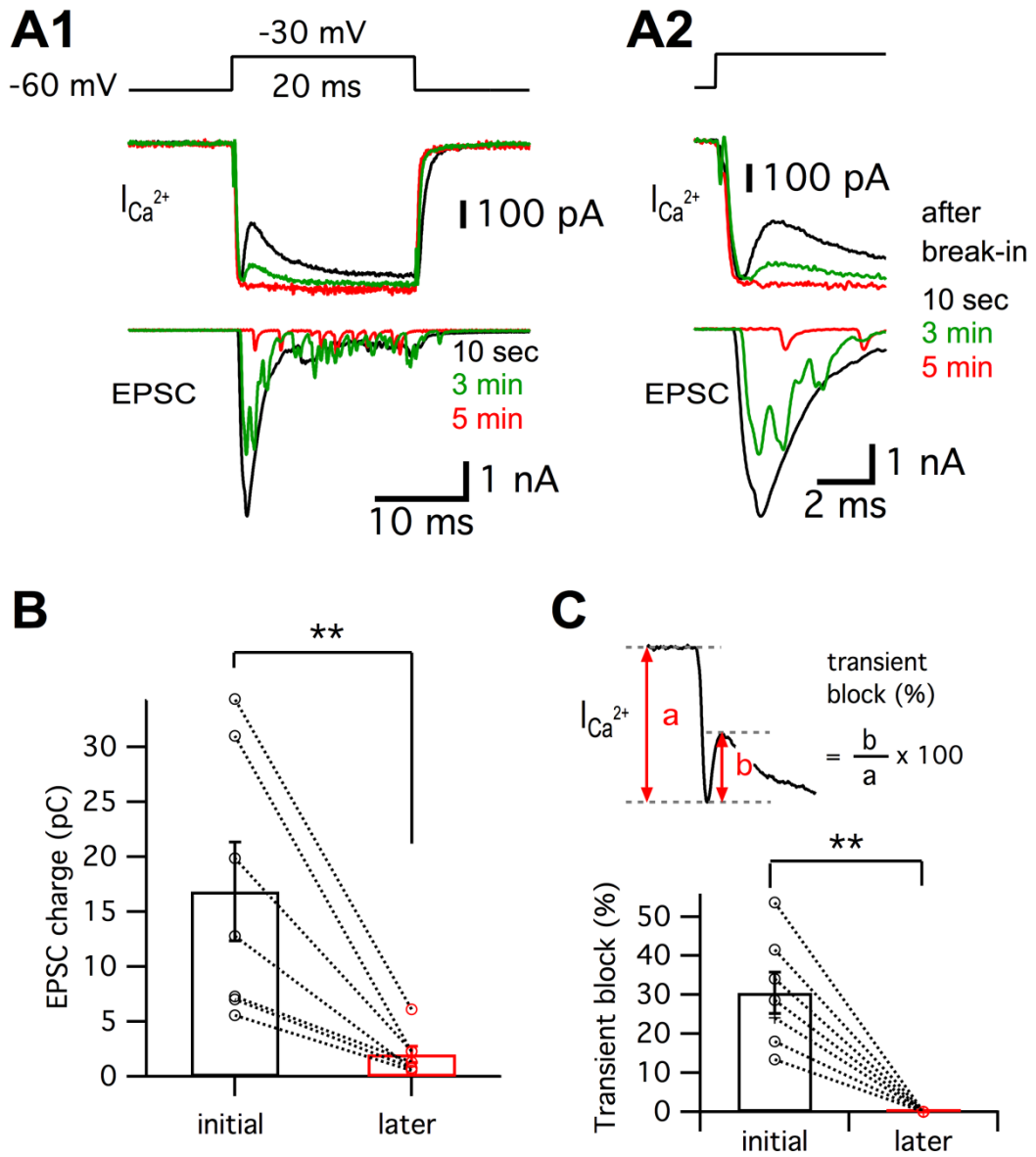
**Supp Figure 1: Small asynchronous  $I_{CaTB}$  and their sensitivity to extracellular HEPES**

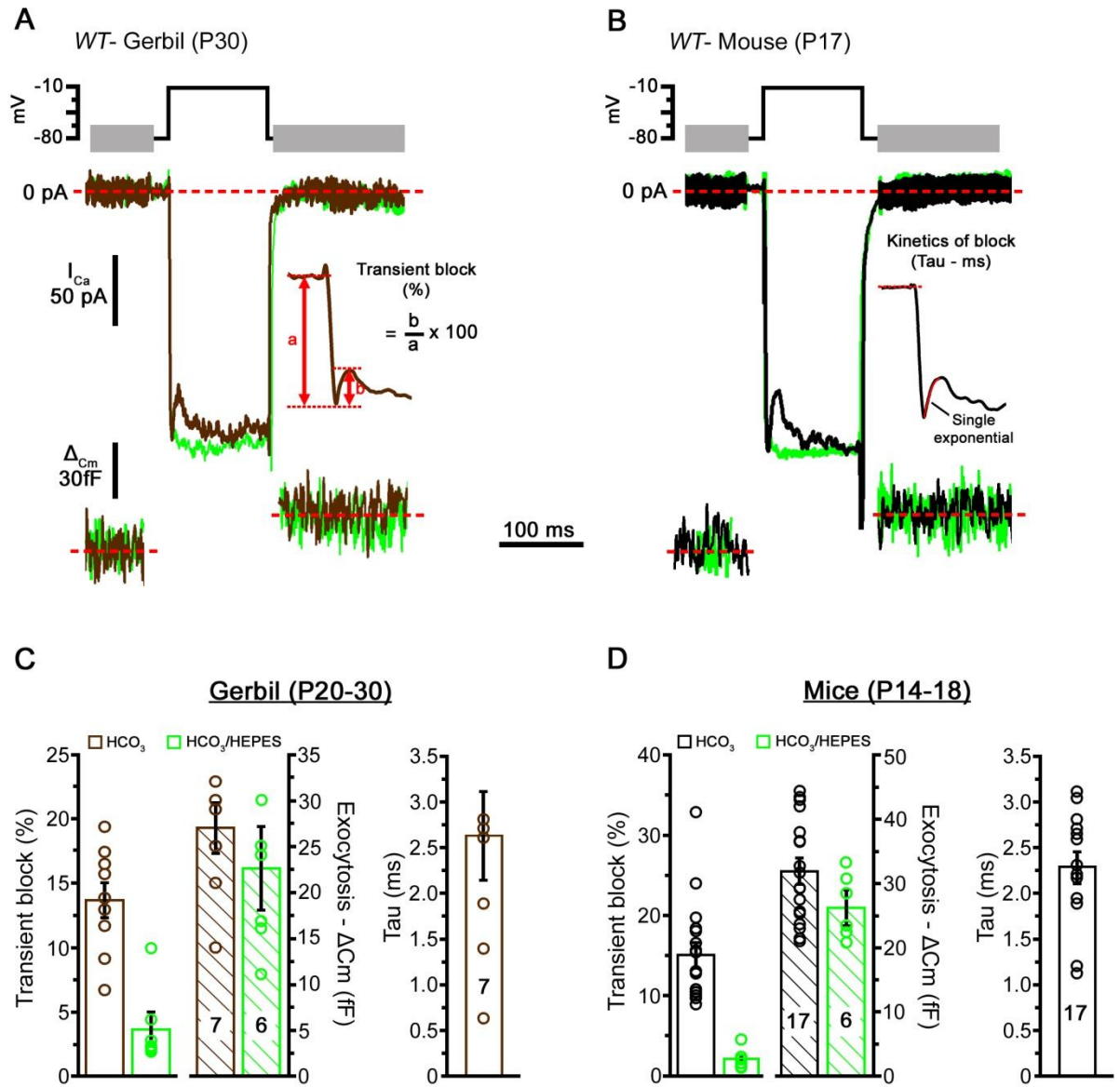
$Ca^{2+}$  currents were evoked in response to a 100 ms-step depolarization from -80 mV to -10 mV.

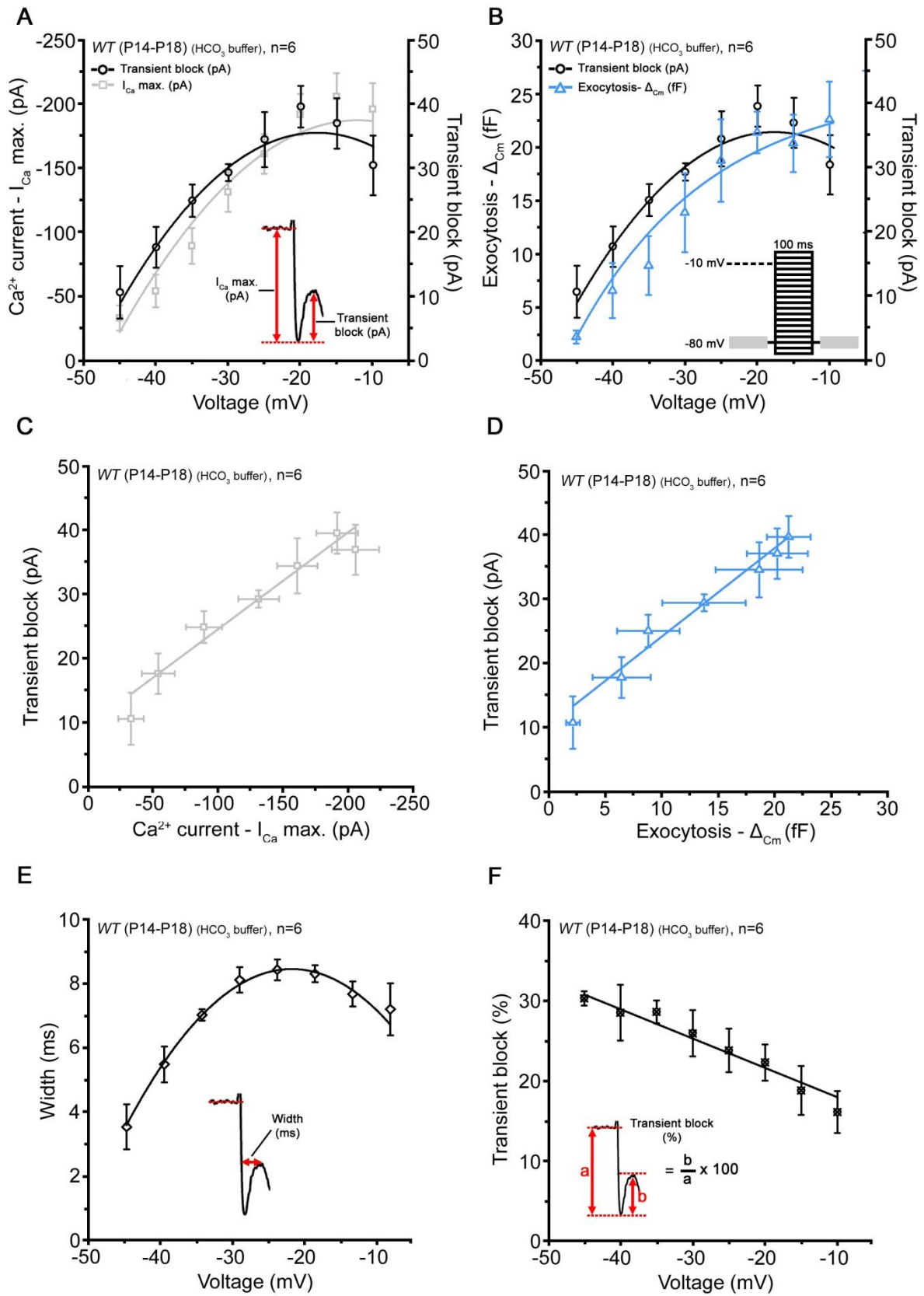
(A) Example of  $I_{CaTB}$  in a WT-IHC: Asynchronous small  $I_{CaTB}$  events (asterisks) can be seen after the first large (synchronous) response (arrow heads) in 25 mM bicarbonate (top trace, black line). In presence of 10 mM HEPES both the first large and small events are abolished (bottom trace, green line).

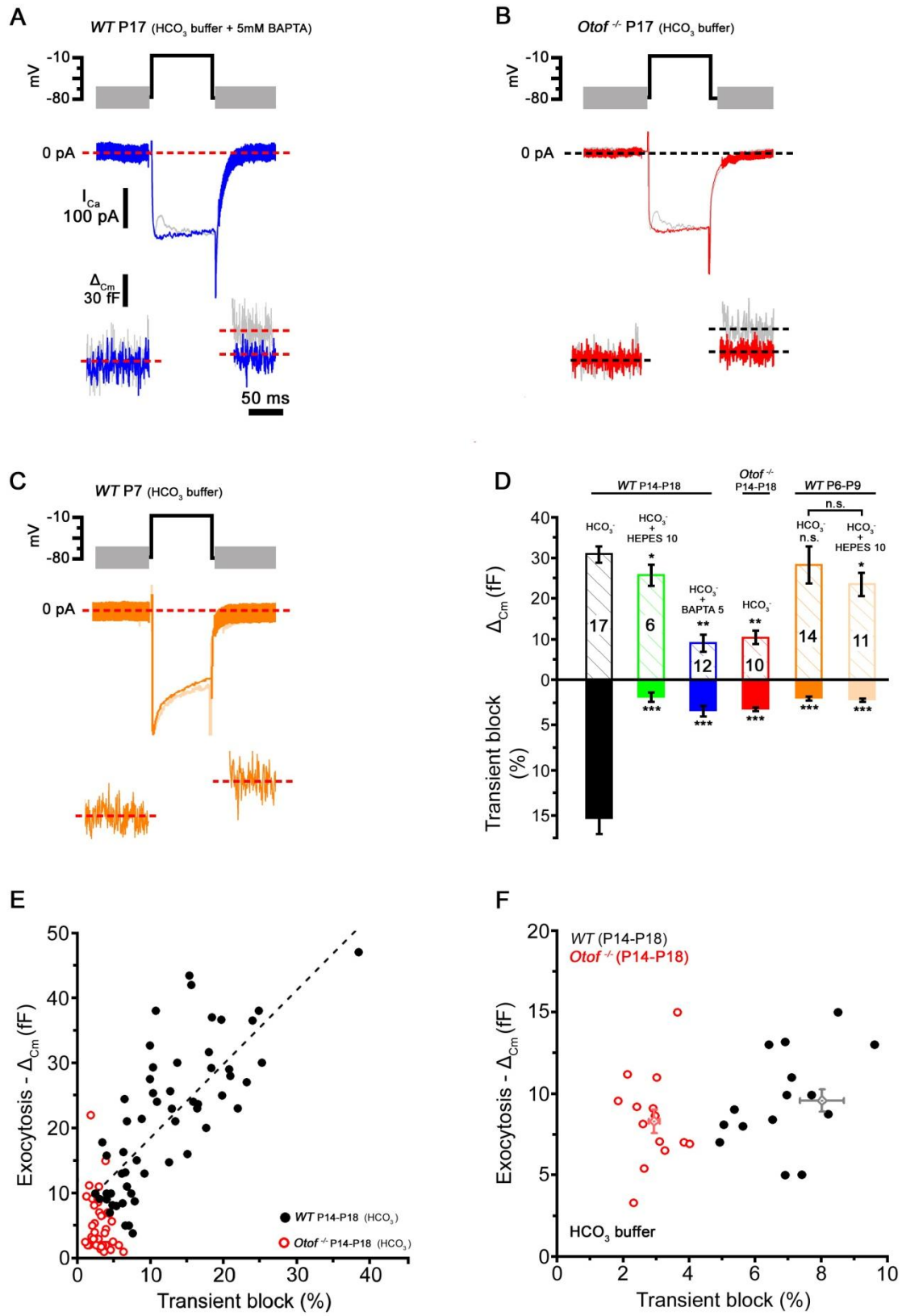
(B) Example  $I_{CaTB}$  in a WT-IHC recorded with 5 mM intracellular BAPTA: the first large synchronous event is largely reduced (asterisk, top trace, blue line) but the secondary small events are preserved (asterisks). In 10 mM extracellular HEPES,  $I_{CaTB}$  events are abolished (bottom trace, light blue line).

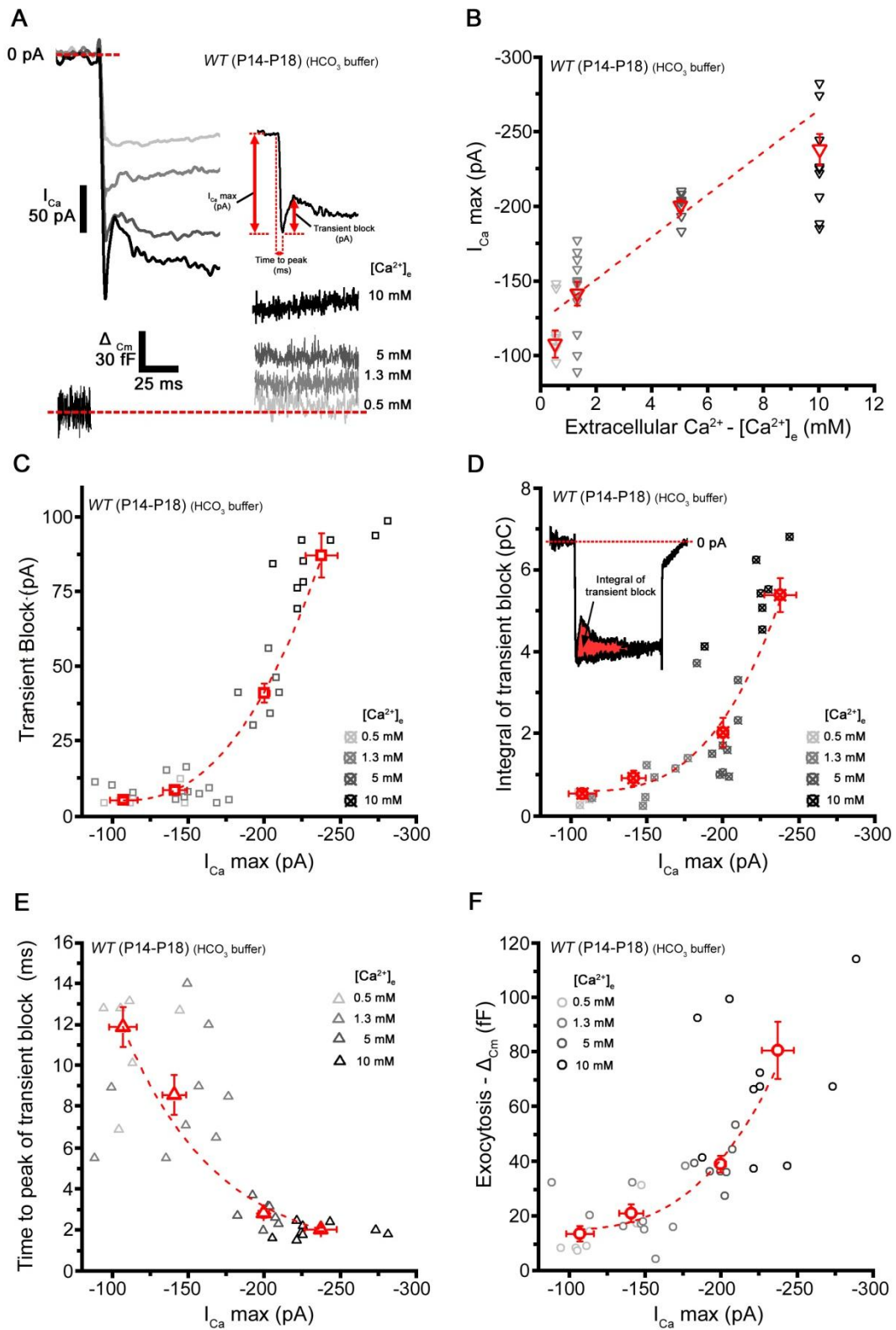
(C) Example  $I_{CaTB}$  in an *Otof*<sup>-/-</sup> IHC: the asynchronous  $I_{CaTB}$  events release are present but largely reduced in amplitude (top trace, red line). In 10 mM extracellular HEPES, all  $I_{CaTB}$  events are abolished.

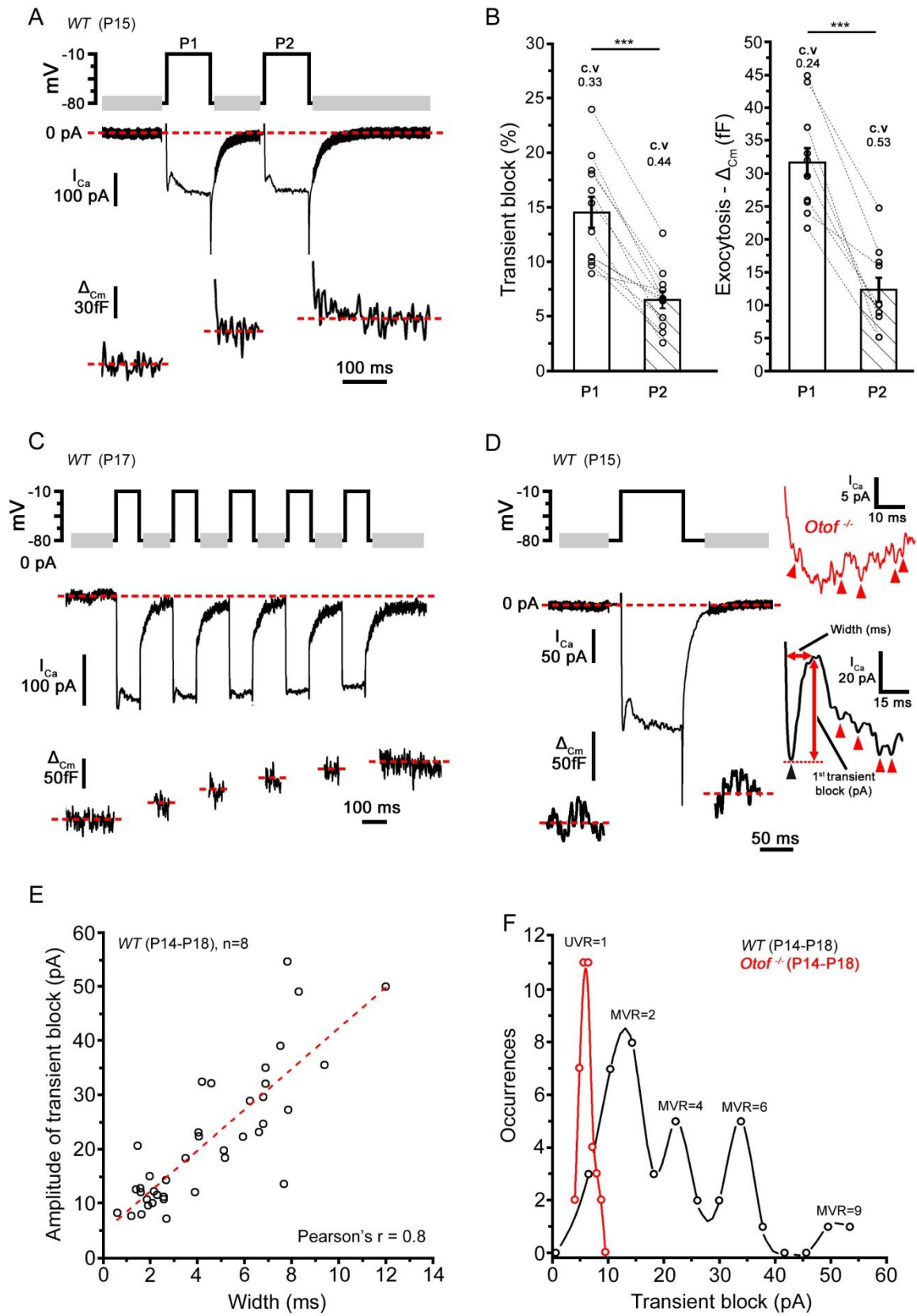


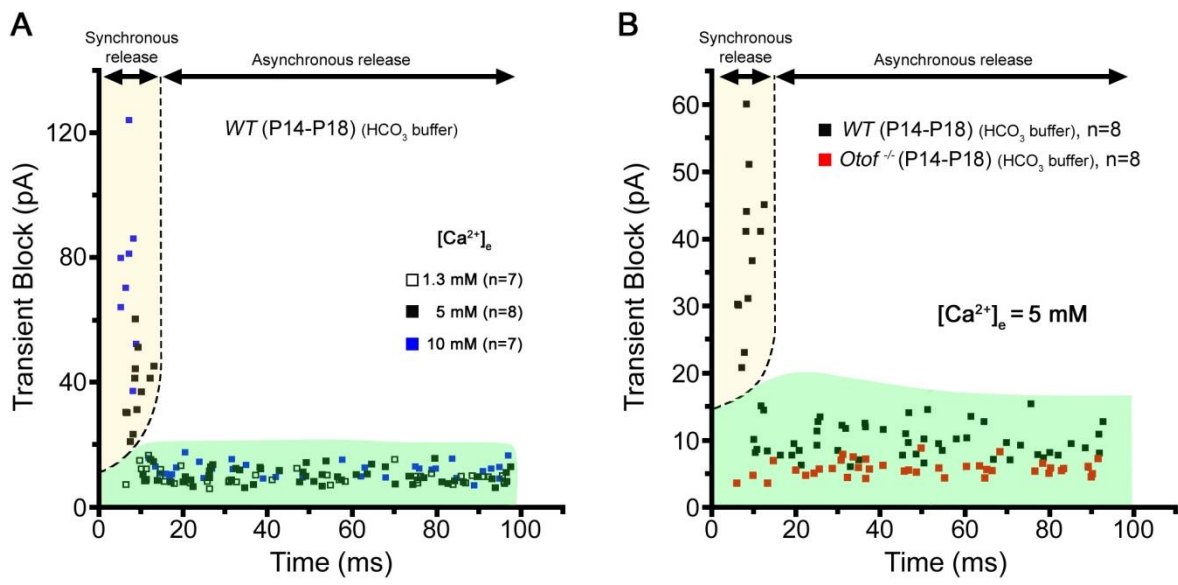




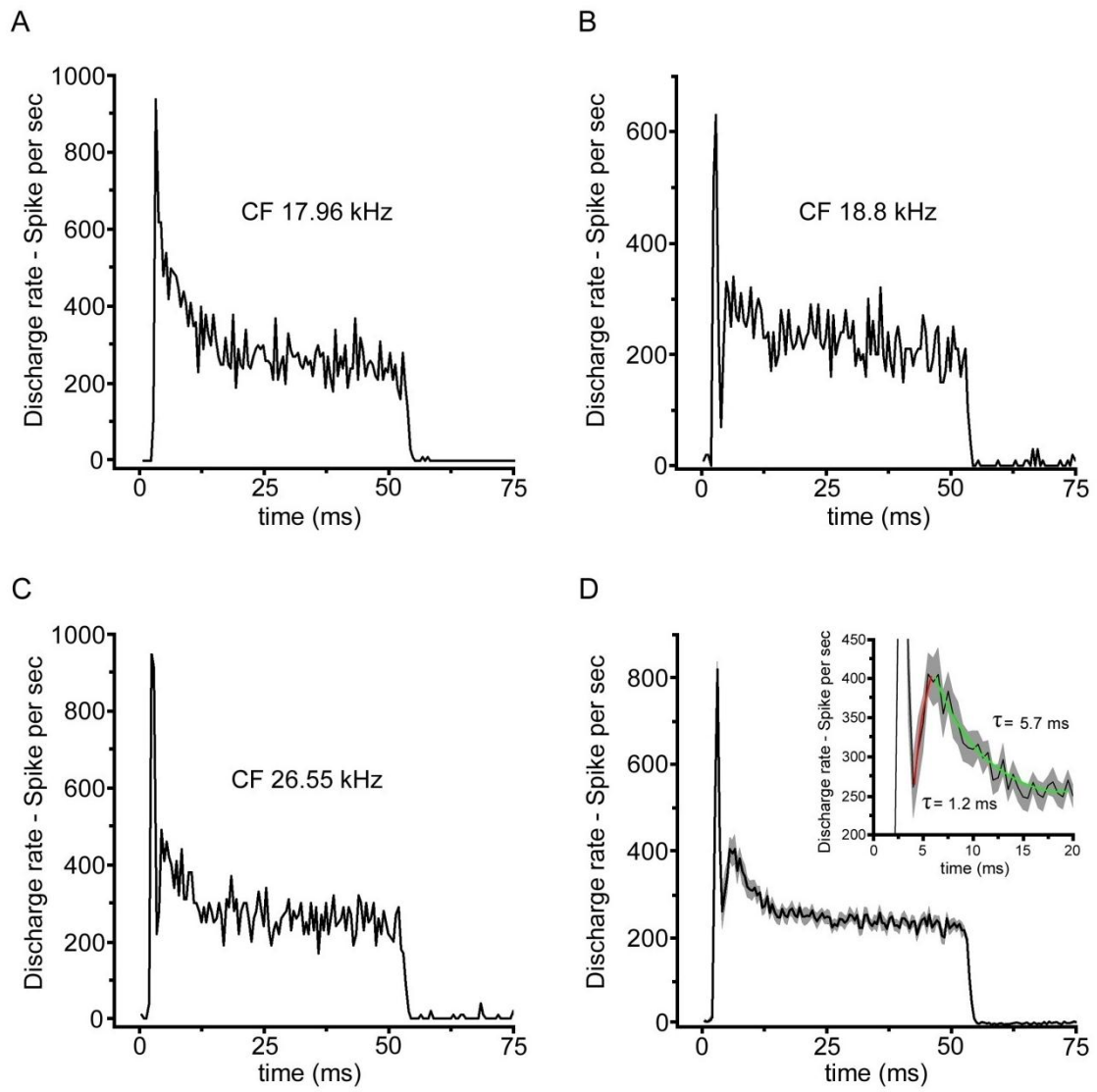


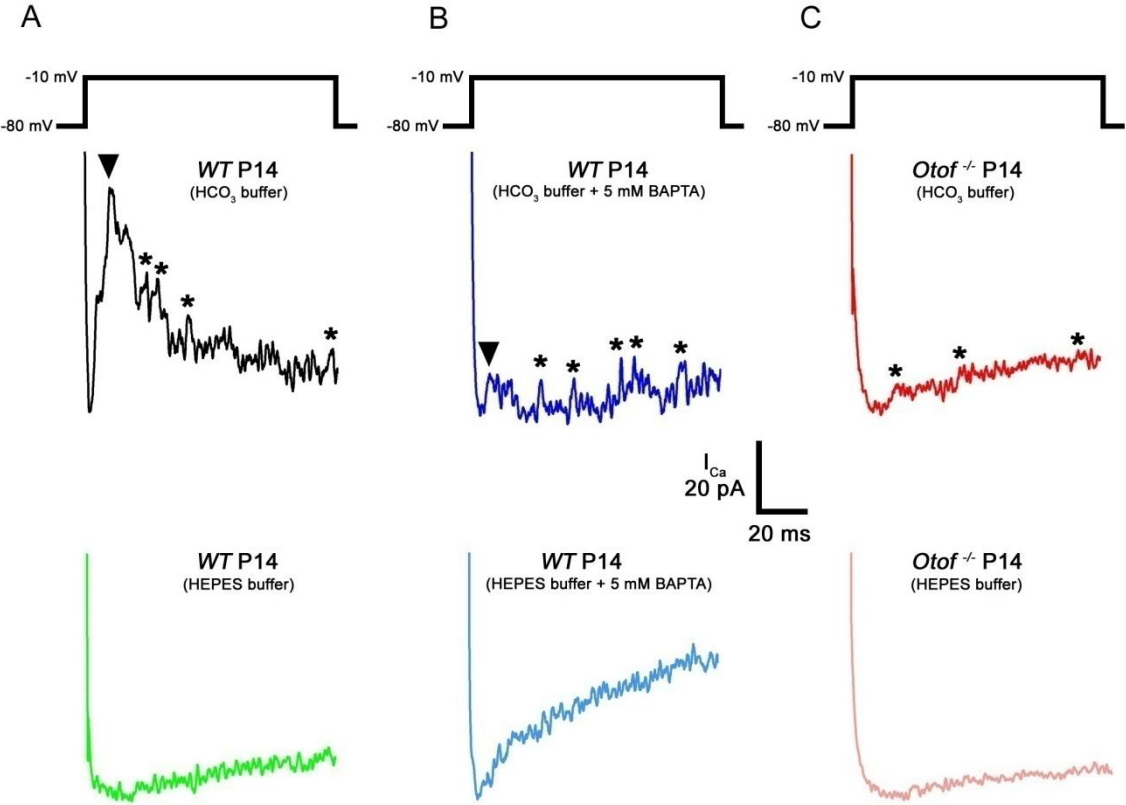












# **Article 4**

## **A Synaptic F-Actin Network Controls Otoferlin-Dependent Exocytosis in Auditory Inner Hair Cells**

**Philippe FY Vincent**, Yohan Bouleau, Christine Petit and Didier Dulon

*Elife* (2015) Nov 14;4. pii: e10988. doi: 10.7554/eLife.10988

## **Introduction**

L'actine-F régule à la fois la mobilité vésiculaire et la tension membranaire dans de nombreux types cellulaires (cellules endocrines et neurones du système nerveux centrale). Le but de notre étude était d'étudier le rôle de l'actine-F à la fois, dans l'organisation des canaux calciques Cav1.3 et dans le trafic des vésicules synaptiques des CCI. Dans ce but, nous avons disloqué l'actine-F synaptique par l'utilisation de la toxine latrunculine-A et nous avons étudié le rôle de la tension du cytosquelette sur l'exocytose en faisant varier la pression hydrostatique intracellulaire.

## **Résultats**

- Le réseau d'actine forme des cages micrométriques autour de chacune des zones actives des CCI.
- Les canaux calciques Cav1.3 sont désorganisés lorsque le réseau d'actine-F est détruit par la toxine latrunculine A, suggérant un rôle important du cytosquelette dans le maintien des canaux calciques à la membrane.
- La destruction des filaments d'actine induit une facilitation et une accélération de l'exocytose des CCI suggérant un meilleur réapprovisionnement vésiculaires des sites de fusion.
- L'augmentation de la pression hydrostatique intracellulaire induit une augmentation et une facilitation de l'ensemble des paramètres biophysiques des courants calciques suggérant une mécano-sensibilité des canaux Cav1.3.
- L'exocytose est facilité par l'augmentation de la pression hydrostatique intracellulaire.

## **Conclusion**

Notre étude propose donc que le réseau d'actine des CCI permet de contrôler le flux de vésicules jusqu'aux sites de fusion par la formation de cage autour de chacune des ZAs. L'actine-F est aussi essentielle dans la régulation de la tension membranaire en conférant à l'exocytose une sensibilité à la pression hydrostatique intracellulaire. De plus le cytosquelette d'actine apparaît important pour maintenir les canaux calciques sous chaque ruban et réguler ainsi l'efficacité de l'exocytose des CCI.

# A synaptic F-actin network controls otoferlin-dependent exocytosis in auditory inner hair cells

Philippe FY Vincent<sup>1\*</sup>, Yohan Bouleau<sup>1</sup>, Christine Petit<sup>2,3,4,5,6</sup>, Didier Dulon<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Bordeaux Neurocampus, Equipe Neurophysiologie de la Synapse Auditive, Université de Bordeaux, Bordeaux, France; <sup>2</sup>Unité de Génétique et Physiologie de l'Audition, Institut Pasteur, Paris, France; <sup>3</sup>UMRS 1120, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Paris, France; <sup>4</sup>Sorbonne Universités, UPMC Université Paris, Paris, France; <sup>5</sup>Syndrome de Usher et Autres Atteintes Rétino-Cochléaires, Institut de la Vision, Paris, France; <sup>6</sup>Collège de France, Paris, France

**Abstract** We show that a cage-shaped F-actin network is essential for maintaining a tight spatial organization of Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels at the synaptic ribbons of auditory inner hair cells. This F-actin network is also found to provide mechanosensitivity to the Cav1.3 channels when varying intracellular hydrostatic pressure. Furthermore, this F-actin mesh network attached to the synaptic ribbons directly influences the efficiency of otoferlin-dependent exocytosis and its sensitivity to intracellular hydrostatic pressure, independently of its action on the Cav1.3 channels. We propose a new mechanistic model for vesicle exocytosis in auditory hair cells where the rate of vesicle recruitment to the ribbons is directly controlled by a synaptic F-actin network and changes in intracellular hydrostatic pressure.

DOI:10.7554/eLife.10988.001

\*For correspondence: philippe.vincent@inserm.fr (PFV); didier.dulon@inserm.fr (DD)

**Competing interests:** The authors declare that no competing interests exist.

**Funding:** See page 11

**Received:** 19 August 2015

**Accepted:** 12 November 2015

**Published:** 14 November 2015

**Reviewing editor:** Christian Rosenmund, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Germany

© Copyright Vincent et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

## Introduction

Auditory hair cells convert tiny variations of sound pressure through the displacement of their apical hair bundles into analogous voltage waveforms. Neural encoding of these microphonic potentials occurs at the ribbon synapses of inner hair cells (IHCs) by mechanisms involving Cav1.3 channels (Platzter et al., 2000; Brandt et al., 2003; Brandt et al., 2005) and otoferlin-dependent exocytosis of synaptic vesicles (Roux et al., 2006; Beurg et al., 2010; Vincent et al., 2014). Unlike most neuronal central synapses, IHCs have the extraordinary property to sustain indefatigably high rates of exocytosis during continuous sound stimulation (Safieddine et al., 2012). The precise molecular mechanisms underlying this fast and massive recruitment of synaptic vesicles to the IHC ribbon active zones still remain elusive. The implication of an unconventional molecular regulation of synaptic vesicle fusion and replenishment of the releasable pool of vesicles has been proposed (Nouvian et al., 2011; Vogl et al., 2015). In other secretory cells such as neuroendocrine cells, a network of sub-membranous cortical F-actin is known to influence exocytosis greatly by tightly regulating plasma membrane tension and the access of the granules to the secretory sites (Apo-daca, 2002; Torregrosa-Hetland et al., 2011; Gutierrez and Gil, 2011). In central neuronal synapses, F-actin is also involved in maintaining vesicle pools and regulating vesicle mobility (Cingolani and Goda, 2008). Electron-tomography evidence for F-actin and microtubules near the synaptic ribbons has been observed in bullfrog hair cells (Graydon et al 2011). Whether IHC synaptic exocytosis is modulated by F-actin remains unknown. Other factors affecting membrane tension and exocytosis in many cell types, such as mast cells, include hydrostatic pressure across the membrane (Solsona et al., 1998). This latter factor has also been shown to influence the spontaneous

**eLife digest** To hear a sound, the pressure produced by sound waves must be converted into an electrical nerve signal. The cells inside the ear that perform this transformation are called hair cells, which are so named because they have hundreds of hair-like structures on their upper surface. Pressure from sound waves causes movements in the inner ear that bend these 'hairs'. This causes the hair cells to release chemical signals to neighboring nerve cell terminals that ultimately transmit information about the sound to the brain.

The chemical signals are stored inside the hair cells in bubble-like compartments called vesicles. To release the chemicals from the cell, the vesicles merge with the membrane that surrounds the hair cell. Most cells that communicate in this way are limited in how long they can transmit such messages. However, hair cells can continuously fuse vesicles to the membrane even when a sound lasts for a long time. This suggests that the hair cells have a different way of producing vesicles and getting them to the membrane than other cell types.

Inside the hair cells, vesicles are stored in regions called active zones. Each active zone contains a "ribbon" (attached to which are hundreds of vesicles) and also ion channels that allow calcium ions to flow into the cell. (An increase in calcium ion concentration inside the cell is necessary for the vesicle to fuse with the cell membrane and so release its chemical content). Now, Vincent et al. show that in hair cells, a cage-like network made from a protein called actin surrounds each active zone. This network helps to position the calcium ion channels. Treating the hair cells with a compound that disorganized the actin networks speed up the process of vesicle movement, which suggests that the actin network also controls the rate at which vesicles reach the membrane.

Next, it will be important to identify how the actin network interacts with other molecules that help vesicles to release their contents; in particular a protein called otoferlin, which is thought to act as a calcium ion sensor.

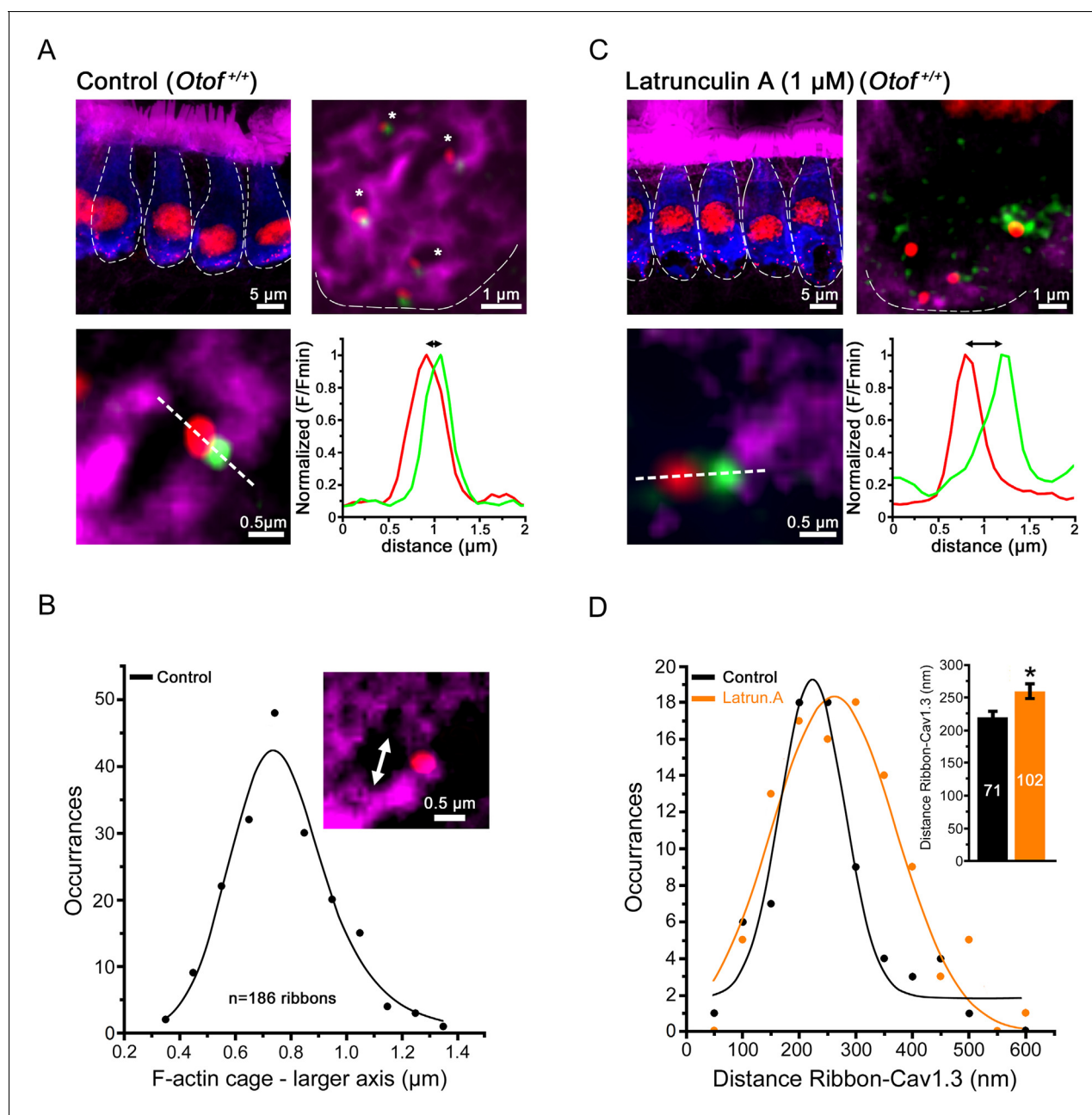
[DOI:10.7554/eLife.10988.002](https://doi.org/10.7554/eLife.10988.002)

and evoked activity of vestibular hair cells of the dogfish by mechanisms that remain unknown (*Fraser and Sheldermine, 2002*). In the present study, we investigated whether F-actin and intracellular hydrostatic pressure regulate synaptic exocytosis in mouse IHCs.

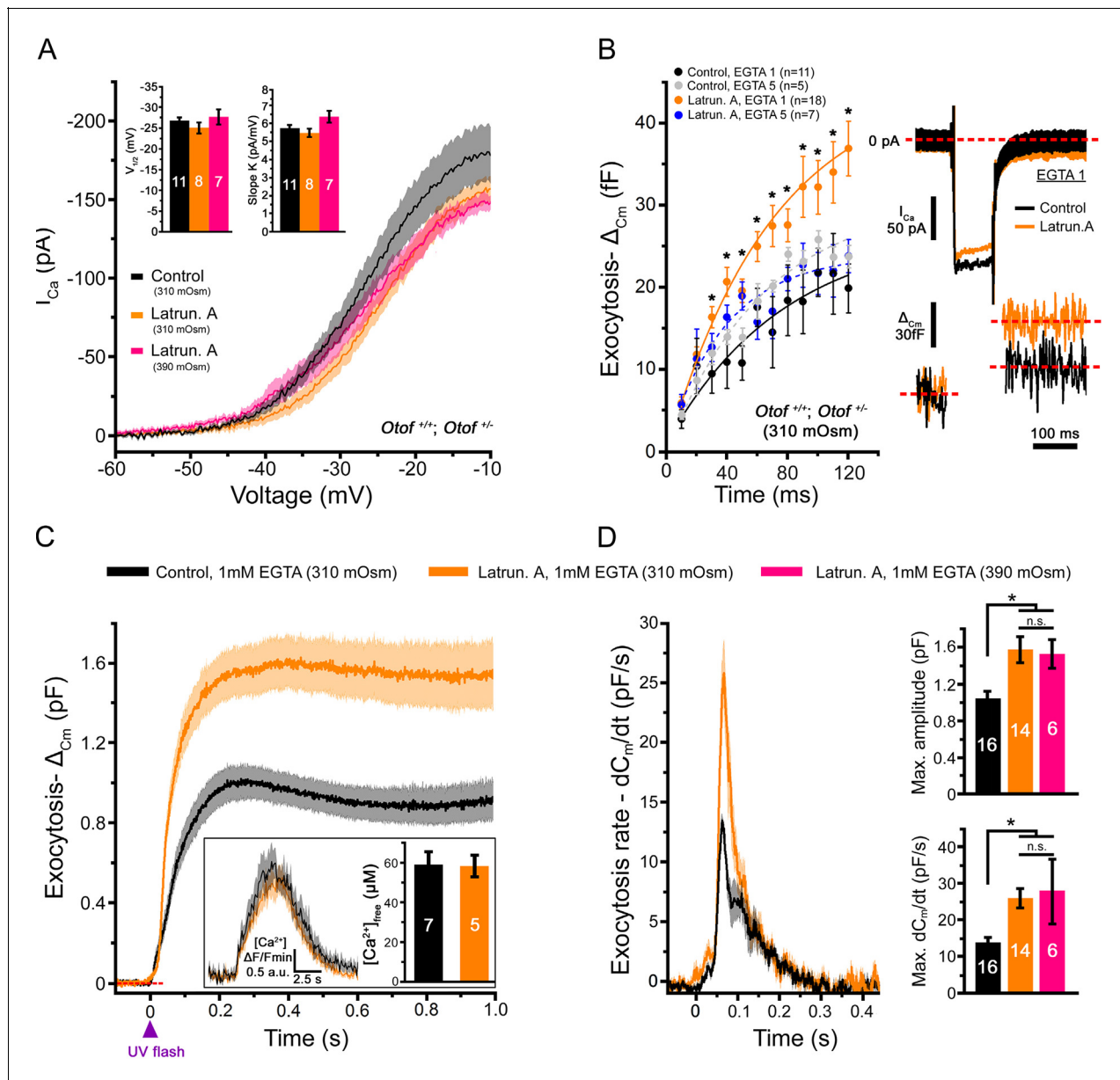
## Results and discussion

Direct labeling of F-actin with fluorescent phalloidin revealed the presence of a dense F-actin network that surrounded the IHC ribbon synaptic zones (**Figure 1A**). This network extended underneath the plasma membrane and formed intracellular dense cages beneath the synaptic ribbons. These cages displayed a mean size diameter of  $0.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$  ( $n = 186$  active zones; **Figure 1B**). Overlapping with otoferlin, each F-actin cage was generally associated with one ribbon and one Cav1.3 co-immunoreactive patch. Similarly,  $\text{Ca}^{2+}$  channels and the secretory machinery have been shown to be associated with the borders of F-actin cytoskeletal cages in chromaffin cells (*Torregrossa-Hetland et al., 2011*).

A 45-min treatment of the organ of Corti in vitro with  $1 \mu\text{M}$  extracellular latrunculin-A completely disorganized the synaptic F-actin cages and the Cav1.3 immunoreactive-patches at the IHC ribbons (Figure 1C, D). The mean distance between the Cav1.3 immunoreactive patches and the ribbons increased from  $218 \pm 11 \text{ nm}$  ( $n = 71$ ) in controls to  $260 \pm 12 \text{ nm}$  with latrunculin-A treatment ( $n = 102$ ;  $p < 0.05$ ). In the latter conditions, surprisingly, whole-cell patch clamp recordings revealed a largely facilitated exocytosis as compared to controls, while voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  currents were unchanged (Figure 2A,B). After 100 ms depolarization, from  $-80$  to  $-10 \text{ mV}$ , the exocytotic response in control IHCs reached a maximum amplitude of  $22.0 \pm 2.9 \text{ fF}$  ( $n = 11$ ). Considering that a  $40 \text{ nm}$  diameter synaptic vesicle corresponds to  $37 \text{ aF}$  (*Lenzi et al., 1999*), we estimated a RRP size of about 590 vesicles, i.e 33 vesicles per ribbons if we assume a number of 18 ribbons per IHCs. This number of RRP vesicles fit well with previous findings (*Johnson et al., 2008; Vincent et al., 2014*). In latrunculin-treated IHCs, the exocytotic responses reached, at 100 ms,  $32.4 \pm 3.3 \text{ fF}$  ( $n = 18$ ), a value significantly larger as compared to control IHCs ( $p < 0.05$ ; **Figure 2B**). Remarkably, while the exocytotic response saturated at 90–100 ms in controls, the response did not show saturation in



**Figure 1.** Confocal imaging of the synaptic F-actin cages in IHCs. **(A)** Confocal images from averaged Z-stack projection (20 slices of 0.25  $\mu\text{m}$ ) of P13-IHCs labeled in blue with otoferlin-immuno-reactivity. Directly visualized with fluorescent-phalloidin (purple), F-actin intensively labelled the cuticular plate and the stereocilia but also in a punctated manner the synaptic basal pole of the IHCs. In this latter area, at higher magnification (averaged Z-stack projection of 8 slices of 0.25  $\mu\text{m}$ ), the synaptic F-actin forms a mesh of cages (see right panel where the blue channel of otoferlin is omitted; the cages are indicated by the white asterisks). At each border of the synaptic F-actin cages was generally attached one synaptic ribbon (red) and one associated Cav1.3 patch (green) as indicated in the lower left panel. The graph represents an example of fluorescent intensity profile through the white dashed line crossing the ribbon and the associated Cav1.3. **(B)** The graph indicates the Gaussian distribution of the larger axis (double white arrow head) of each F-actin cage. **(C)** A 45 min treatment with extracellular latrunculin-A disrupted the synaptic F-actin cages. The black holes at the base of the IHCs likely indicated swollen IHC active zones produced by the synaptic F-actin disorganization. At higher magnification (right panel), note also the disorganization of the Cav1.3 clusters (green) at the ribbons, as indicated by a larger distance in their respective fluorescent intensity profile distribution (bottom graph). **(D)** Comparative Gaussian distribution of the center mass distance between Cav1.3 and ribbon in controls (black,  $n = 71$  active zones) and latrunculin-treated (orange,  $n = 102$  active zones) IHCs. The inset histogram indicates the mean  $\pm$  SEM distance in both conditions. \* $p < 0.05$ . DOI: 10.7554/eLife.10988.003



**Figure 2.** Latrunculin-A treatment facilitated exocytosis in IHCs. **(A)**  $Ca^{2+}$  currents, evoked by a voltage-ramp protocol, were not significantly affected by latrunculin-A (orange). The parameters of the Boltzman fit are indicated by the histograms (mean  $\pm$  SEM). Rising intracellular osmotic pressure from 310 mOsm to 390 mOsm did not affect the  $Ca^{2+}$  currents in latrunculin-treated IHCs (pink). For each curve, the darker line indicates the mean responses and the light filled area the standard error. **(B)** Exocytosis evoked by voltage-steps from -80 mV to -10 mV was largely facilitated after latrunculin-A treatment. At right, examples of  $Ca^{2+}$  currents and capacitance jumps ( $\Delta C_m$ ) are shown for a control (black traces) and latruncutin-treated IHC (orange traces). In 5 mM intracellular EGTA condition, the facilitation was greatly reduced (blue points). Data are represented as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ . **(C)** Exocytosis under  $Ca^{2+}$  uncaging was also facilitated after latrunculin-A treatment. The jump in the concentration of intracellular free  $Ca^{2+}$  was similar in control and latrunculin-treated IHCs (inset;  $p = 0.9$ ). **(D)** Left, comparative exocytotic rates of control and latrunculin-treated IHCs obtained from the first derivative ( $dC_m/dt$ ) of the curves in C. Right, comparative maximum exocytotic amplitude and peak rate histograms (mean  $\pm$  SEM). Increasing intracellular hydrostatic pressure from 310 to 390 mOsm (pink bars) did not affect exocytosis in latrunculin-treated IHCs. Numbers of cells are indicated in the histogram. \* $p < 0.05$  and n.s. as non significant.

DOI: 10.7554/eLife.10988.004

latrunculin-treated IHCs. Since the exocytotic response was unchanged for short impulses below 30 ms (**Figure 2B**), these results suggested that the disruption of F-actin did not affect the steps of vesicle docking and priming but facilitated the replenishment of the RRP. In bassoon mutants with



abnormal number of anchored ribbons and reduced  $\text{Ca}^{2+}$  currents both short (20 ms) and long (100 ms) impulse activated-exocytosis were affected (*Jing et al., 2013*).

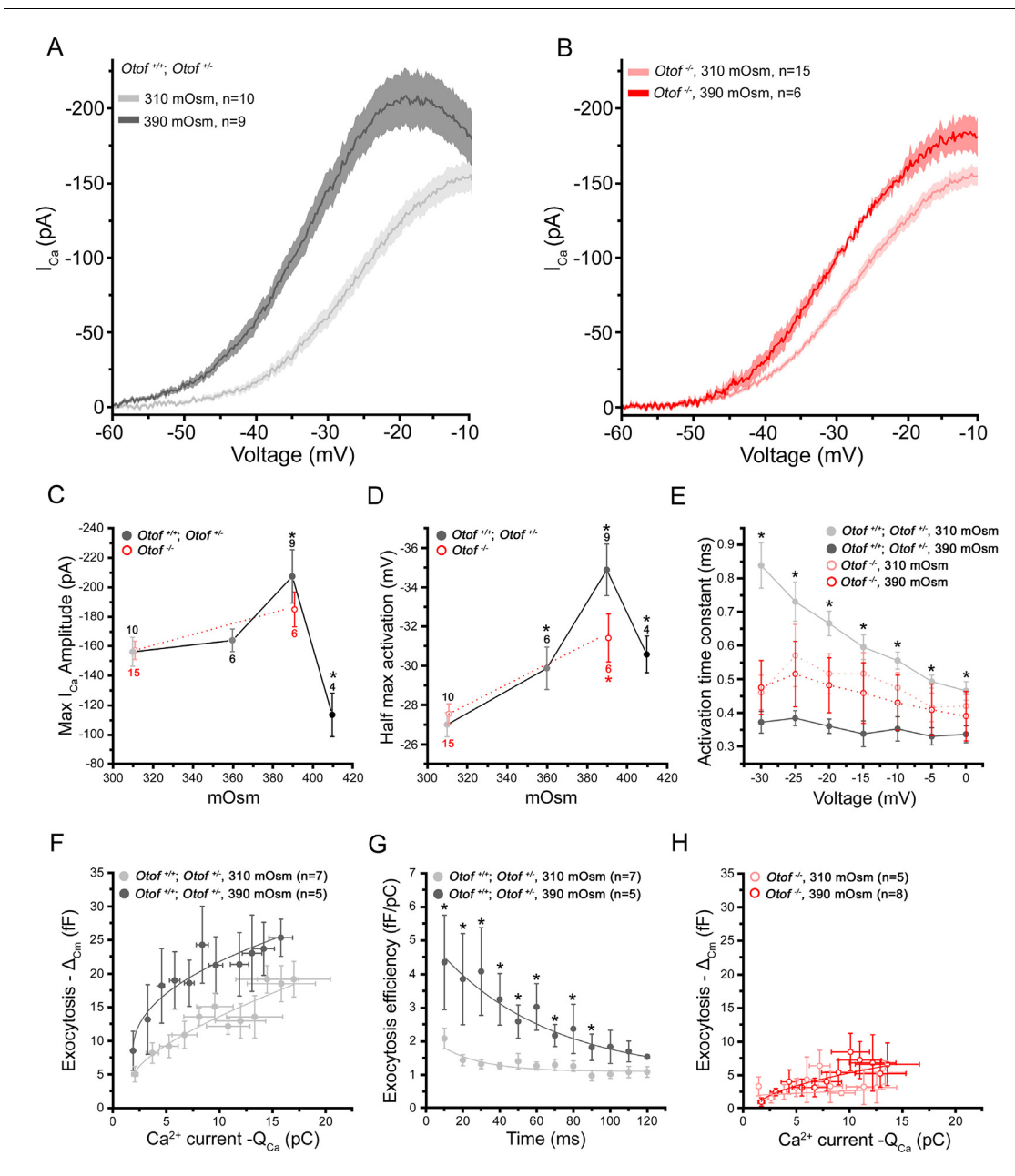
The exocytotic facilitation in latrunculin-treated IHCs was greatly reduced to  $21.8 \pm 2.5$  fF at 100 ms ( $n = 7$ ) and comparable to controls ( $p=0.9$ ) when intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  buffering was increased with 5 mM EGTA (**Figure 2B**). This sensitivity to EGTA suggested a spatial disorganization of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel clusters in regards to the release sites in latrunculin-treated IHCs, in good agreement with confocal imaging (Figure 1C,D). Raising the EGTA concentration could also affect the extent to which neighboring calcium sources interact and summate to produce a global effect on free calcium.

The intriguing question now is: why is the disruption of the synaptic F-actin with latrunculin-A facilitating exocytosis in IHCs? One explanation is that the synaptic F-actin network, in addition to organizing  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains, also acts as a diffusion barrier for synaptic vesicles limiting the access to the site of release, as suggested in some central synapses (*Cingolani and Goda, 2008*). Its disruption with depolymerising agents would therefore facilitate vesicle replenishment of the release sites, as shown in a large variety of secretory cells (*Malacombe et al., 2006*), by increasing the number of available vesicles for docking and priming. Alternatively, a disrupted F-actin could facilitate the diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  from its sites of entry and stimulate replenishment.

To directly test these hypothesis, we studied the effect of F-actin depolymerization on exocytosis triggered by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging, i.e. independently of the activation and the organization of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels. In these experiments, a large exocytotic facilitation was also observed in latrunculin-treated IHCs (Figure 2C,D). The peak exocytotic rate, obtained by measuring the first derivative function of the curves in **Figure 2C**, was nearly two fold larger in latrunculin-treated IHCs as compared to controls (**Figure 2D**;  $25.9 \pm 2.7$  pF/s ( $n = 14$ ) and  $13.7 \pm 1.7$  pF/s ( $n = 16$ ), respectively;  $p < 0.05$ ). The levels of the peak intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ ) reached upon UV-flash  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging were verified to be similar in control ( $n = 7$ ) and latrunculin-treated IHCs ( $n = 5$ ), respectively  $59 \pm 7$   $\mu\text{M}$  and  $57 \pm 5$   $\mu\text{M}$  ( $p=0.9$ ; Figure 2C-inset). These  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging experiments again suggested that a synaptic F-actin network controls the diffusion rate of the synaptic vesicles to the sites of release in IHCs.

Furthermore, since intracellular hydrostatic pressure has been suggested to influence membrane tension and exocytosis through the F-actin network in many cell types such as mast cells (*Solsona et al., 1998*), we probed  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked exocytosis under various intracellular osmotic pressures in auditory IHCs. We first found that increasing intracellular osmotic pressure from 310 to 390 mOsm with sucrose produced a significant increase in the resting membrane capacitance of IHCs. The resting size of IHCs, voltage-clamped at -80 mV for a period of 2 min after break-in, was  $9.93 \pm 0.27$  pF ( $n = 11$ , 310 mOsm) and  $11.10 \pm 0.34$  pF ( $n = 10$ , 390 mOsm;  $p < 0.05$ ), respectively. This augmentation of the IHC resting membrane capacitance was about 50 times larger than the size of the RRP evoked by membrane depolarization (Figure 2B; RRP = 22 fF). Where does this large addition of membrane come from? One possible explanation was that high intracellular hydrostatic pressure triggers the fusion of a large amount of extrasynaptic vesicles to the plasma membrane, as previously suggested for  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging (*Vincent et al., 2014*).

Remarkably, in these latter conditions of intracellular hyperosmotic stress at 390 mOsm, voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  currents displayed larger amplitude (Figure 3A,C) and accelerated activation kinetics as compared to control conditions at 310 mOsm (**Figure 3E**). A shift in their voltage-dependence toward more negative potentials was also observed (Figure 3A,D). The hydrostatic pressure effects on  $\text{Ca}^{2+}$  currents were no longer visible when IHCs were pre-treated with latrunculin-A (**Figure 2A**, pink line) and were greatly reduced in IHCs lacking otoferlin (*Otof*<sup>-/-</sup>; Figure 3B,C). This indicated that the Cav1.3 channels of IHCs are mechanosensitive, like the Cav1.2 channels in smooth muscle cells (*Lyford et al., 2002*). We cannot exclude the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  channels to the plasma membrane during the massive vesicular fusion caused by increased hydrostatic pressure. However, this mechanism appears unlikely in regards to results obtained in non-secretory cells such as smooth muscle and HEK cells where similar effect on  $\text{Ca}^{2+}$  channels were obtained (*Lyford et al., 2002*). In our study, the sensitivity to membrane tension in IHCs required an intact synaptic F-actin network and otoferlin, a proposed synaptic  $\text{Ca}^{2+}$  sensor thought to interact physically with the Cav1.3 II-III loop (*Ramakrishnan et al., 2009*). Notably, an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  current amplitude in low bath hydrostatic pressure (equivalent to increasing intracellular pressure) was also reported in dissociated guinea pig vestibular hair cells (*Duong Dinh et al., 2009*; *Haasler et al., 2009*). In these latter studies, the change in  $\text{Ca}^{2+}$  currents could be interpreted as due to a pressure activation of  $\text{K}^+$  currents



**Figure 3.** Intracellular hydrostatic pressure modulates  $Ca^{2+}$  currents and exocytosis. (A) Comparative  $Ca^{2+}$  currents evoked by a voltage-ramp protocol in  $Otof^{+/+}$  and  $Otof^{+/-}$  IHCs (expressing otoferlin). Cells were recorded with intracellular osmotic pressure at 310 mOsm (n = 10) or at 390 mOsm (n = 9). The darker line indicates the mean responses and the light filled area the standard error. (B)  $Ca^{2+}$  currents in  $Otof^{-/-}$  IHCs (lacking otoferlin) recorded in conditions similar to A. (C-D) Both maximum amplitude and half-maximum voltage-activation of  $Ca^{2+}$  currents were maximally affected at 390 mOsm. Note that the slopes of the Boltzman fit of the activation curve in A and B were found slightly affected in IHCs expressing otoferlin (310 mOsm:  $K = 5.90 \pm 0.14$  pA/mV, n = 10 and 390 mOsm:  $K = 5.36 \pm 0.09$  pA/mV, n = 9;  $p < 0.05$ ) but not in  $Otof^{-/-}$  IHCs (310 mOsm:  $K = 6.18 \pm 0.20$  pA/mV, n=6 and 390 mOsm:  $K = 5.89 \pm 0.28$ , n = 6;  $p = 0.71$ ) (data not shown). Data are represented as mean  $\pm$  SEM, with the number of cells indicated above each point and (\*) indicating  $p < 0.05$ . (E) Activation kinetics of  $Ca^{2+}$  currents, evoked by voltage-steps from -80 mV to different voltage levels, were significantly faster at 390 mOsm in hair cells expressing otoferlin but not in  $Otof^{-/-}$  IHCs. For unknown reason the activation kinetics were faster in  $Otof^{-/-}$  IHCs as compared to IHCs expressing otoferlin. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ . The number of cell is similar to D. (F)  $Ca^{2+}$  efficiency of exocytosis was plotted as the change in membrane capacitance ( $\Delta C_m$ ) against the integral of the calcium current ( $Q_{Ca}$ ) when depolarizing IHCs at a constant voltage-step from -80 to -10 mV with increasing duration from 10 to 120 ms. Data points at 310 mOsm and 390 mOsm were fitted with a power function with a  $Ca^{2+}$  efficiency slope  $A = 2.47 \pm 0.45$  fF/pC and  $9.30 \pm 2.5$  fF/pC ( $p < 0.05$ ) and a (power cooperative index) = 0.33 and 0.51 ( $p = 0.52$ ), respectively. The supralinear power cooperative index of 0.3 and 0.51 found here was somewhat lower to previous values reported by **Cho et al. (2011)** and **Johnson et al (2005)**. (G) The exocytotic efficiency of each data point in F ( $\Delta C_m/Q_{Ca}$ ) was plotted for each depolarizing time at 310 mOsm

Figure 3. continued on next page

Figure 3. Continued

and 390 mOsm. Data were fitted with an exponential function with  $22.2 \pm 10.4$  ms and  $50.1 \pm 11.9$  ms, respectively ( $p < 0.05$ ). (H)  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency of exocytosis (recorded in conditions similar to F) was unaffected when rising osmotic pressure from 310 to 390 mOsm in *Otof*<sup>-/-</sup>IHCs. Data were best fitted with a linear function with a similar slope of  $0.12 \pm 0.1$  fF/pC and  $0.48 \pm 0.1$  fF/pC ( $p = 0.2$ ) at 310 and 390 mOsm, respectively. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ .

DOI: 10.7554/eLife.10988.005

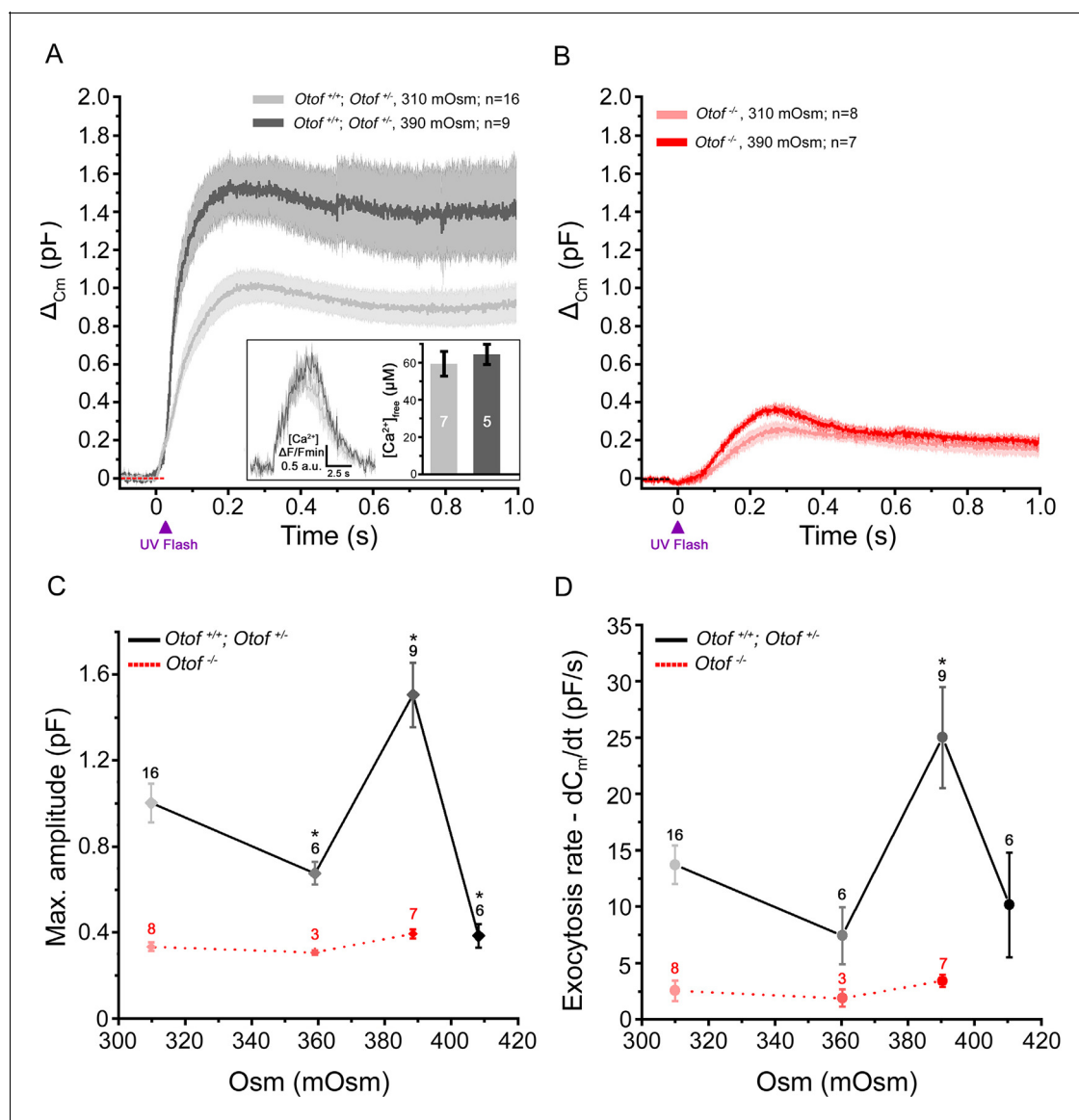
leading to less pronounced depolarization. Although pressure effects on  $\text{K}^+$  currents have also been shown in guinea-pig IHCs (*Kimitsuki, 2013*), we don't think that these currents would influence our  $\text{Ca}^{2+}$  current measurements since we were working in conditions where most  $\text{K}^+$  currents are blocked. Overall, our results suggested here that the mechanosensitivity of the Cav1.3 channels is mediated through an intact synaptic F-actin network.

Exocytosis triggered by voltage-activation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels from -80 to -10 mV (a voltage at which  $\text{Ca}^{2+}$  current amplitude is maximum, *Figure 3A*) also showed maximum facilitation when intracellular pressure was increased from 310 to 390 mOsm (*Figure 3F,G*). Notably, on the contrary to what observed when disrupting the synaptic F-actin, exocytosis increased for short impulses (10–20 ms) at 390 mOsm (*Figure 3F,G*), suggesting that the last steps of vesicle exocytosis (docking, priming and/or fusion) were here accelerated. Exocytosis for longer steps up to 90 ms also increased, from  $1.40 \pm 0.23$  fF/pC ( $n = 7$ , 310 mOsm) to  $2.58 \pm 0.49$  fF/pC ( $n = 5$ , 390 mOsm;  $p < 0.05$ ) at 50 ms (*Figure 3G*). These latter results suggested that the replenishment rate of the RRP was also accelerated.

This facilitation of exocytosis, under intracellular hyperosmotic stress, appeared unrelated to the effects on  $\text{Ca}^{2+}$  channels since it was also observed when directly uncaging intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (*Figure 4*). The levels of the peak  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$  reached upon UV-flash  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging were verified to be similar in 310 mOsm ( $n = 7$ ) and 390 mOsm ( $n = 5$ ) conditions,  $59 \pm 7$   $\mu\text{M}$  and  $64 \pm 6$   $\mu\text{M}$  ( $p = 0.6$ ; *Figure 4A-inset*). In these latter conditions of intracellular hyperosmotic stress, the strength of exocytotic facilitation was maximal at 390 mOsm and abruptly decreased at 410 mOsm, a high pressure at which the intrinsic organization of the IHC exocytotic machinery may have been damaged. At 390 mOsm, the maximum amplitude of the exocytotic response was  $1.5 \pm 0.15$  pF ( $n = 9$ ) as compared to  $1.0 \pm 0.1$  pF ( $n = 16$ ) in controls at 310 mOsm ( $p < 0.05$ ; *Figure 4A,C*). The peak exocytotic rate was largely increased at 390 mOsm as compared to 310 mOsm ( $25.0 \pm 4.5$  pF/s ( $n = 9$ ) and  $13.7 \pm 1.7$  pF/s ( $n = 16$ ), respectively;  $p < 0.05$ , *Figure 4D*). Interestingly, the facilitation of exocytosis by high intracellular hydrostatic pressure was not observed in IHCs treated with latrunculin-A (*Figure 2D*, pink bars) and in *Otof*<sup>f/-</sup> IHCs (*Figure 3H* and *Figure 4B–D*). The peak  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$  reached upon UV-flash  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging was unchanged in *Otof*<sup>f/-</sup> IHCs as compared to control IHCs (*Vincent et al., 2014*).

Overall, the facilitation of exocytosis by high intracellular hydrostatic pressure could be explained by an increased membrane tension that impacts on membrane fusion (*Kozlov and Chernomordik, 2015*) but also by an increased vesicular mobility, possibly as the result of reduced molecular crowding and loosened vesicle interactions, accelerating the replenishment rate. In the same way, the mobility of vesicles in pancreatic cells and primary hepatocytes was shown to be affected by hydrostatic pressure, a process related to molecular crowding and microfilaments polymerization (*Nunes et al., 2015*).

Do large changes in hydrostatic pressure occur in the cochlea during physiological or pathological conditions? In the cochlea, large intercompartmental osmotic gradients from 289 to 322 mOsm/kg  $\text{H}_2\text{O}$  are present between the perilymphatic and endolymphatic compartments, respectively (*Sterkers et al., 1984*). These osmotic gradients are likely regulated by aquaporins present in outer sulcus cells (*Eckhard et al., 2015*) and genetic deletion of aquaporin-4 in mice leads to impaired hearing (*Li and Verkman, 2001*). Osmolarity changes in these inner fluid compartments have long been suspected to be contributing factors to inner ear disorders such as tinnitus and fluctuating hearing loss, inclusive of Menière's disease (*Angelborg et al., 1982*). The outer hair cells, producing the electro-mechanical amplification of sound in the cochlea, have been shown to be mechanically sensitive to extracellular osmotic variation (*Dulon, et al., 1987*), a factor that greatly influence hearing (*Choi and Oghalai, 2008*). Our study, showing that IHC exocytosis is sensitive to osmotic forces,



**Figure 4.** Exocytosis triggered by  $Ca^{2+}$  uncaging is sensitive to intracellular hydrostatic pressure. (A) Exocytosis in IHCs expressing otoferlin was largely potentiated when rising osmotic pressure from 310 mOsm (light grey) to 390 mOsm (dark grey). The darker line in each condition indicates the mean responses and light filled area the standard error. The jump in the concentration of intracellular free  $Ca^{2+}$  was similar in 310 and 390 mOsm conditions (inset;  $p = 0.6$ ). (B) Exocytosis evoked in  $Otof^{-/-}$  IHCs in conditions similar to A. (C-D) Comparative maximum amplitude and peak exocytotic rate at various intracellular osmotic pressure. The results showed a maximum facilitation at 390 mOsm. These pressure effects were not seen on the residual slow exocytosis of  $Otof^{-/-}$  IHCs. Data points are means  $\pm$  SEM. The number of IHCs is indicated above each point. \*  $p < 0.05$ .

DOI: 10.7554/eLife.10988.006

suggests that a defect in synaptic transmission at the auditory ribbon synapses may also underlie some hearing disorders associated with Menière's disease.

In conclusion, we propose that a synaptic F-actin network tightly controls the flow of synaptic vesicles during exocytosis at the IHC ribbons. This synaptic F-actin network also influences the sensitivity of exocytosis to hydrostatic pressure changes, presumably through a regulation of membrane tension at the active zones. Such actin-based regulation of intracellular hydrostatic pressure and membrane tension, recently shown in a variety of physiological processes such as in the secretory properties of neuroendocrine cells (de Wit, 2010; Gutiérrez and Gil, 2011), the mitotic cell rounding during cell division (Stewart et al., 2011), the photomechanical responses of photoreceptors (Hardie and Franze, 2012) to name a few, is here described for the first time in auditory hair cells.

## Materials and methods

### Tissue preparation

Experiments were performed in accordance with the guidelines of the Animal Care Committee of the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and were approved by the ethics committee of the University of Bordeaux (animal facility agreement number C33-063-075). All mice (C57BL6 of either sex) were anesthetized by intraperitoneal injection of xylazine (6 mg/ml) and ketamine (80 mg/ml) mixture (Sigma Aldrich, St Louis, USA) diluted in physiological saline. The organs of Corti were dissected as previously described (Vincent *et al.*, 2014).

Electrophysiological recordings were obtained from littermate  $Otof^{+/+}$ ,  $Otof^{+/-}$  or from knock-out (KO) otoferlin ( $Otof^{-/-}$ ) C57BL6 mice at postnatal day 12–16 (P12–P16) inner hair cells (IHCs) in whole-mount organs of Corti in the apical cochlear area coding for frequencies ranging from 8 to 16 kHz.

The organ of Corti (OC) was freshly dissected under binocular microscopy in an extracellular solution maintained at 4°C containing (in mM): NaCl 135; KCl 5.8;  $CaCl_2$  1.3;  $MgCl_2$  0.9;  $NaH_2PO_4$  0.7; Glucose 5.6; Na pyruvate 2; HEPES 10, pH 7.4, 305 mOsm. The tectorial membrane was carefully removed and the OC was placed in a recording chamber and visualized under a 60x water immersion objective (CFI Fluor 60X W NIR, WD = 2.0 mm, NA = 1) attached to an upright Nikon FN1 microscope. The extracellular solution was complemented with 0.5  $\mu$ M of apamin (Latoxan, Valence, France) and 0.2  $\mu$ M of XE-991 (Tocris Bioscience, Lille, France) to block SK channels and KCNQ4 channels, respectively. All  $Ca^{2+}$  current and capacitance recordings were performed in the presence of 5 mM extracellular  $Ca^{2+}$  and carried out at room temperature (20–24°C).

### Whole cell recording and capacitance measurement

All patch clamp experiments were performed with an EPC10 amplifier controlled by pulse software Patchmaster (HEKA Elektronik, Germany). Patch pipettes were pulled with a micropipette Puller P-97 Flaming/Brown (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) and fire-polished with a Micro forge MF-830, (Narishige, Japan) to obtain a resistance range from 3 to 5 M $\Omega$ . Patch pipettes were filled with an intracellular cesium-based solution containing (in mM): CsCl 145;  $MgCl_2$  1; HEPES 5; EGTA 1; TEA 20; ATP 2 and GTP 0.3; pH 7.2, 310 mOsm. To increase intracellular osmotic pressure, the cesium-based solution was complemented with different concentrations of sucrose (17g/L for 360 mOsm; 27g/L for 390 mOsm and 34 g/L for 410 mOsm).

Current-voltage (I-V) curves were recorded using two different protocols. First, cells were maintained at -80 mV and depolarized with a ramp protocol (1 mV/ms) from -90 mV to +30 mV in 120 ms. The voltage parameters (half max activation potential and the slope) of the IV curves were given by fitting the IV curves from -70 mV to -10 mV with a Boltzmann sigmoidal function:

$$y = \frac{A1 - A2}{1 + \exp^{(V - V_{1/2})/K}} \quad (1)$$

Where A1 and A2 are the minimum and the maximum y value. V is the voltage value and  $V_{1/2}$  is the half max voltage activation, K is the slope of the IV curve. Second, cells were step-depolarized from -80 mV to -5mV in 5mV increments for a constant time duration of 100 ms. Activation kinetics of the  $Ca^{2+}$  currents were determined at different potentials with the latter protocol by using a single exponential fit:

$$y = y_0 + A1\exp^{(-x/t)} \quad (2)$$

Where  $y_0$  is the offset of activation, A1 the amplitude of the  $Ca^{2+}$  current and t the time constant.

Real-time capacitance measurements ( $C_m$ ) were performed using the Lock-in amplifier Patchmaster software (HEKA) by applying a 1 kHz command sine wave (amplitude 20 mV) at holding potential (-80 mV) before and after the pulse experiment, as previously described (Vincent *et al.*, 2014). The time interval between each depolarization was set at 10 seconds to allow full replenishment of the RRP. The exocytosis efficiency was determined by fitting the data points with a power function:

$$\Delta C_m = y_0 + A[x - x_c]^a \quad (3)$$

Where  $y_0$  is the initial value (fF), A the  $Ca^{2+}$  efficiency slope (fF/pC), a the power cooperative index,  $x_c$  the  $Ca^{2+}$  charge ( $Q_{Ca}$  in pC) threshold of the response and x (pC) the  $Q_{Ca}$  value for each



stimulation. The relationship between the  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency and the time was fitted with an exponential function:

$$y = y_0 + A1e^{-(x-x_0)/t} \quad (4)$$

Where  $y_0$  et  $x_0$  are the y and x offset, A1 the amplitude and t the time constant.

Only cells with stable membrane resistance ( $R_m$ ), leak current below 50 pA at holding potential (-80 mV) and stable series resistance below 15 M $\Omega$  were considered in the study. All  $\text{Ca}^{2+}$  currents were leak-subtracted.

### Caged $\text{Ca}^{2+}$ photolysis

To trigger a fast increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration from the caged  $\text{Ca}^{2+}$  chelator DM-nitrophen (Interchim, France), we used 200 ms brief flashes from a UV LED light source (Mic-LED 365, 128mW, Prizmatix, Givat Shmuel, Israel). The UV LED was directly connected to the epi-illumination port at the rear of our upright Nikon FN1 microscope and illumination was focalized through the 60X objective (CFI Fluor 60X W NIR, WD = 2.0 mm, NA=1). Hair cells were loaded with in mM, CsCl 145; HEPES 5; TEA 20; DM-nitrophen 10;  $\text{CaCl}_2$  10. In some experiments, in order to check that similar  $\text{Ca}^{2+}$  release occurs in all our conditions, we added 50  $\mu\text{M}$  OGB-5N in the intracellular solution. To determine the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{free}$ ), we used the following formula:

$$[\text{Ca}^{2+}]_{free} = K_D \times \frac{(F - F_{min})}{(F_{max} - F)} \quad (5)$$

Where  $[\text{Ca}^{2+}]_{free}$  is the caged  $\text{Ca}^{2+}$  released by the UV flash,  $K_D$  the constant dissociation of OGB-5N. We used the value of 23.3  $\mu\text{M}$  determined by our previous *in vivo* calibration (Vincent *et al.*, 2014). F the over time fluorescence,  $F_{min}$  the minimum fluorescence and  $F_{max}$  the maximal fluorescence. Fluorescence signals were plotted and compared as  $\Delta F/F_{min}$  where  $\Delta F$  is equal to:  $F - F_{min}$ . To vary the intracellular osmotic pressure from 310 to 360, 390 or 410 mOsm, the DM-nitrophen solution was complemented with sucrose as described above.

### Immunohistofluorescence

P13 organs of Corti (OC) were rapidly fixed with 100% methanol at  $-20^\circ\text{C}$  for 30 min and washed with cold phosphate buffered saline (PBS). The tectorial membrane was carefully removed. Tissues were first incubated with PBS containing 30% normal horse serum for 1 hr at room temperature (RT). Then they were incubated with primary antibodies diluted with PBS (1:200) containing 5% horse serum and 0.1% triton X-100. The organization of the sub-membranous actin-F network was visualized using Phalloidin Fluoprobe 405 (1:100, Interchim, Montlucon, France; cat # FP-CA9870). Synaptic ribbons (CtBP2), Cav1.3 channels and otoferlin were simultaneously labeled with anti-CtBP2 (Goat polyclonal, Santa Cruz, USA; cat # SC-5966), anti-Cav1.3 (Rabbit polyclonal, Alomone labs, Jerusalem, Israel; cat # ACC-005) and anti-otoferlin (Mouse monoclonal, Abcam, Paris, France; cat # ab53233) antibodies, respectively. The organ of Corti was then washed with PBS and incubated in two steps with secondary antibodies at 1:500: first, Donkey anti-Goat Fluoprobe 547H (Interchim; cat # FP-SB2110) and Donkey anti-Mouse Fluoprobe 647 (Interchim; cat # FP-SC4110), second, after a PBS rinse with Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen; cat # A-11008). To disrupt F-actin, the organs of Corti were incubated prior to fixation with 1  $\mu\text{M}$  latrunculin-A (Interchim, France; cat # FP-47143A) for 45 min at RT.

Confocal imaging was performed with a Leica SP8 confocal laser-scanning microscope with a 63X oil immersion objective (NA = 1.4) and white light laser (470 to 670 nm) (Bordeaux Imaging Center). Phalloidin was imaged by using a diode laser at 405 nm also mounted on the microscope.

Stack images were acquired with the following parameters: laser power 40%, scan rate 700 Hz, scans averaged per XY section 4 times, step size 250 nm, pixel size 80 nm giving an X-Y image size of 41 x 41  $\mu\text{m}$  (512 x 512 pixels). Images were then processed for three-dimensional (3D) blind deconvolution with AutoQuant X2 (MediaCybernetics). After deconvolution, images were processed with ImageJ software (W.S. Rasband, NIH, Bethesda, USA). Distance measurements between CtBP2 (ribbon) and the Cav1.3 channels were performed using the Image J software after 3D blind

deconvolution, as previously described (Vincent *et al.*, 2014). The plot profile tool of Image J was used to determine the mean distance between the ribbon and the Cav.3 patch (center mass distance).

## Statistical analysis

Electrophysiological results were analyzed with Patchmaster (HEKA Elektronik, Germany), OriginPRO 9.1 (OriginLab, Northampton, USA) and IgorPro 6.3 (Wavemetrics, Oregon, USA). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed by using the non-parametric Mann-Whitney U test with OriginPRO 9.1 software. The number of samples for each condition was indicated on graphs or in legends. The limit of significance was set at 0.05 ( $p < 0.05$ ). When the statistical tests were found to be non-significant, the  $p$  value was given.

## Acknowledgments

We thank the Bordeaux Imaging Center for providing cutting-edge instruments for high resolution confocal microscopy and Professor Ray Cooke for copyediting the manuscript. This work was supported by the French state program "Investissements d'Avenir" (ANR-10-LABX-65; to C.P.).

## Additional information

### Funding

Funder	Grant reference number	Author
Agence Nationale de la Recherche	ANR-10-LABX-65	Christine Petit

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

### Author contributions

PFYV, DD, Conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article; YB, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data; CP, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article

### Ethics

Animal experimentation: This study was performed in accordance with the guidelines of the Animal Care Committee of the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and were approved by the ethics committee of the University of Bordeaux (animal facility agreement 155 number C33-063-075)

## References

- Angelborg C, Klockhoff I, Larsen HC, Stahle J. 1982. Hyperosmotic solutions and hearing meniere's disease. *The American Journal of Otolaryngology* **3**:200–202.
- Apodaca G. 2002. Modulation of membrane traffic by mechanical stimuli. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* **282**: F179–190.
- Beurg M, Michalski N, Safieddine S, Bouleau Y, Schneggenburger R, Chapman ER, Petit C, Dulon D. 2010. Control of exocytosis by synaptotagmins and otoferlin in auditory hair cells. *Journal of Neuroscience* **30**:13281–13290. doi: [10.1523/JNEUROSCI.2528-10.2010](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2528-10.2010)
- Brandt A, , Khimich D, . Moser T2005. Few CaV1.3 channels regulate the exocytosis of a synaptic vesicle at the hair cell ribbon synapse. *Journal of Neuroscience* **25**:11577–11585. doi: [10.1523/JNEUROSCI.3411-05.2005](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3411-05.2005)
- Brandt A, Striessnig J, Moser T. 2003. CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *Journal of Neuroscience* **23**:10832–10840.
- Cho S, Li G-L, von Gersdorff H. 2011. Recovery from short-term depression and facilitation is ultrafast and Ca<sup>2+</sup> dependent at auditory hair cell synapses. *Journal of Neuroscience* **31**:5682–5692. doi: [10.1523/JNEUROSCI.5453-10.2011](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5453-10.2011)
- Choi C-H, Oghalai JS. 2008. Perilymph osmolality modulates cochlear function. *The Laryngoscope* **118**:1621–1629. doi: [10.1097/MLG.0b013e3181788d72](https://doi.org/10.1097/MLG.0b013e3181788d72)

- Cingolani LA**, Goda Y. 2008. Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature Reviews Neuroscience* **9**:344–356. doi: [10.1038/nrn2373](https://doi.org/10.1038/nrn2373)
- Dulon D**, Aran J-M, Schacht J. 1987. Osmotically induced motility of outer hair cells: implications for meniere's disease. *Archives of Oto-Rhino-Laryngology* **244**:104–107. doi: [10.1007/BF00458558](https://doi.org/10.1007/BF00458558)
- Duong Dinh TA**, Haasler T, Homann G, Jüngling E, Westhofen M, Lückhoff A. 2009. Potassium currents induced by hydrostatic pressure modulate membrane potential and transmitter release in vestibular type II hair cells. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **458**:379–387. doi: [10.1007/s00424-008-0622-2](https://doi.org/10.1007/s00424-008-0622-2)
- Eckhard A**, Dos Santos A, Liu W, Bassiouni M, Arnold H, Gleiser C, Hirt B, Harteneck C, Müller M, Rask-Andersen H, Löwenheim H. 2015. Regulation of the perilymphatic–endolymphatic water shunt in the cochlea by membrane translocation of aquaporin-5. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **467**:2571–2588. doi: [10.1007/s00424-015-1720-6](https://doi.org/10.1007/s00424-015-1720-6)
- Fraser PJ**, Sheldermine RL. 2002. Fish physiology Dogfish hair cells sense hydrostatic pressure. *Nature* **415**:495–496. doi: [10.1038/415495a](https://doi.org/10.1038/415495a)
- Graydon CW**, Cho S, Li G-L, Kachar B, von Gersdorff H. 2011. Sharp Ca<sup>2+</sup> nanodomains beneath the ribbon promote highly synchronous multivesicular release at hair cell synapses. *Journal of Neuroscience* **31**:16637–16650. doi: [10.1523/JNEUROSCI.1866-11.2011](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1866-11.2011)
- Gutierrez LM**, Gil A. 2011. Modeling f-actin cortex influence on the secretory properties of neuroendocrine cells. *Communicative & Integrative Biology* **4**:413–415. doi: [10.4161/cib.15251](https://doi.org/10.4161/cib.15251)
- Haasler T**, Homann G, Duong Dinh TA, Jüngling E, Westhofen M, Lückhoff A. 2009. Pharmacological modulation of transmitter release by inhibition of pressure-dependent potassium currents in vestibular hair cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **380**:531–538. doi: [10.1007/s00210-009-0463-3](https://doi.org/10.1007/s00210-009-0463-3)
- Hardie RC**, Franze K. 2012. Photomechanical responses in drosophila photoreceptors. *Science* **338**:260–263. doi: [10.1126/science.1222376](https://doi.org/10.1126/science.1222376)
- Jing Z**, Rutherford MA, Takago H, Frank T, Fejtova A, Khimich D, Moser T, Strenzke N. 2013. Disruption of the presynaptic cytomatrix protein bassoon degrades ribbon anchorage, multiquantal release, and sound encoding at the hair cell afferent synapse. *Journal of Neuroscience* **33**:4456–4467. doi: [10.1523/JNEUROSCI.3491-12.2013](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3491-12.2013)
- Johnson SL**, Forge A, Knipper M, Munkner S, Marcotti W. 2008. Tonotopic variation in the calcium dependence of neurotransmitter release and vesicle pool replenishment at mammalian auditory ribbon synapses. *Journal of Neuroscience* **28**:7670–7678. doi: [10.1523/JNEUROSCI.0785-08.2008](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0785-08.2008)
- Johnson SL**, Marcotti W, Kros CJ. 2005. Increase in efficiency and reduction in ca<sup>2+</sup> dependence of exocytosis during development of mouse inner hair cells. *The Journal of Physiology* **563**:177–191. doi: [10.1113/jphysiol.2004.074740](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.074740)
- Kimitsuki T**. 2013. The effect of pressure on potassium currents in the inner hair cells isolated from guinea-pig cochlea. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* **73**:521–528.
- Kozlov MM**, Chernomordik LV. 2015. Membrane tension and membrane fusion. *Current Opinion in Structural Biology* **33**:61–67. doi: [10.1016/j.sbi.2015.07.010](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.07.010)
- Lenzi D**, Runyeon JW, Crum J, Ellisman MH, Roberts WM. 1999. Synaptic vesicle populations in saccular hair cells reconstructed by electron tomography. *Journal of Neuroscience* **19**:119–132.
- Li J**. 2001. Impaired hearing in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Journal of Biological Chemistry* **276**:31233–31237. doi: [10.1074/jbc.M104368200](https://doi.org/10.1074/jbc.M104368200)
- Lyford GL**, Strege PR, Shepard A, Ou Y, Ermilov L, Miller SM, Gibbons SJ, Rae JL, Szurzewski JH, Farrugia G. 2002. Alpha 1C (caV1.2) l-type calcium channel mediates mechanosensitive calcium regulation. *AJP: Cell Physiology* **283**:C1001–C1008. doi: [10.1152/ajpcell.00140.2002](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00140.2002)
- Malacombe M**, Bader M-F, Gasman S. 2006. Exocytosis in neuroendocrine cells: new tasks for actin. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1763**:1175–1183. doi: [10.1016/j.bbamcr.2006.09.004](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.004)
- Nouvian R**, Neef J, Bulankina AV, Reisinger E, Pangršič 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. *Nature Neuroscience* **14**:411–413. doi: [10.1038/nn.2774](https://doi.org/10.1038/nn.2774)
- Nunes P**, Roth I, Meda P, Féraille E, Brown D, Hasler U. 2015. Ionic imbalance, in addition to molecular crowding, abates cytoskeletal dynamics and vesicle motility during hypertonic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**:E3104–E3113. doi: [10.1073/pnas.1421290112](https://doi.org/10.1073/pnas.1421290112)
- Platzter 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 Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell* **102**:89–97. doi: [10.1016/S0092-8674\(00\)00013-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00013-1)
- Ramakrishnan NA**, Drescher MJ, Drescher DG. 2009. Direct interaction of otoferlin with syntaxin 1A, SNAP-25, and the l-type voltage-gated calcium channel CaV1.3. *Journal of Biological Chemistry* **284**:1364–1372. doi: [10.1074/jbc.M803605200](https://doi.org/10.1074/jbc.M803605200)
- Roux I**, Safieddine S, Nouvian R, Grati M'hamed, Simmler M-C, Bahloul A, Perfettini I, Le Gall M, Rostaing P, Hamard G, Triller A, Avan P, Moser T, Petit C. 2006. Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell* **127**:277–289. doi: [10.1016/j.cell.2006.08.040](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.040)
- Safieddine S**, El-Amraoui A, Petit C. 2012. The auditory hair cell ribbon synapse: from assembly to function. *Annual Review of Neuroscience* **35**:509–528. doi: [10.1146/annurev-neuro-061010-113705](https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113705)
- Solsona C**, Innocenti B, Fernández JM. 1998. Regulation of exocytotic fusion by cell inflation. *Biophysical Journal* **74**:1061–1073. doi: [10.1016/S0006-3495\(98\)74030-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)74030-5)
- Sterkers O**, Ferrary E, Amiel C. 1984. Inter- and intracompartamental osmotic gradients within the rat cochlea. *The American Journal of Physiology* **247**:F602–606.



- Stewart MP**, Toyoda Y, Hyman AA, Muller DJ. 2011. Force probing cell shape changes to molecular resolution. *Trends in Biochemical Sciences* **36**:444–450. doi: [10.1016/j.tibs.2011.05.001](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.05.001)
- Torregrosa-Hetland CJ**, Villanueva J, Giner D, Lopez-Font I, Nadal A, Quesada I, Viniestra S, Exposito-Romero G, Gil A, Gonzalez-Velez V, Segura J, M. Gutierrez L. 2011. The f-actin cortical network is a major factor influencing the organization of the secretory machinery in chromaffin cells. *Journal of Cell Science* **124**:727–734. doi: [10.1242/jcs.078600](https://doi.org/10.1242/jcs.078600)
- Vincent PFY**, Bouleau Y, Safieddine S, Petit C, Dulon D. 2014. Exocytotic machineries of vestibular type i and cochlear ribbon synapses display similar intrinsic otoferlin-dependent Ca<sup>2+</sup> sensitivity but a different coupling to Ca<sup>2+</sup> channels. *Journal of Neuroscience* **34**:10853–10869. doi: [10.1523/JNEUROSCI.0947-14.2014](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0947-14.2014)
- Vogl C**, Cooper BH, Neef J, Wojcik SM, Reim K, Reisinger E, Brose N, Rhee J-S, Moser T, Wichmann C. 2015. Unconventional molecular regulation of synaptic vesicle replenishment in cochlear inner hair cells. *Journal of Cell Science* **128**:638–644. doi: [10.1242/jcs.162099](https://doi.org/10.1242/jcs.162099)
- Wit Heidi de**. 2010. Molecular mechanism of secretory vesicle docking. *Biochemical Society Transactions* **38**:192–198. doi: [10.1042/BST0380192](https://doi.org/10.1042/BST0380192)

# **Article 5**

## **Clarin-1 as An Essential Organizer of the Auditory Hair Cell Ribbon Synapses**

Didier Dulon, Samantha Papal, Alice Emptoz, Matteo Cortese, **Philippe FY Vincent**, Aziz Tlili, Yohan Bouleau, Vincent Michel, Asadollah Aghaie, Olinda Allegria-Prevot, Omar Akil, Lawrence Lustig, Paul Avan, Saaid Safieddine, Aziz El-Amraoui, and Christine Petit. En préparation

## **Introduction**

Le syndrome d'Usher III (mutation de la clarine 1) se caractérise par une surdité progressive associée à un trouble de l'équilibre et une forme de cécité. A ce jour, la clarine 1 est bien connue comme essentiellement associée à l'organisation et au maintien du réseau très dense de microfilaments d'actine dans les stéréocils des cellules ciliées. La clarine 1 est une petite protéine à quatre segments transmembranaires présentant des similitudes avec la stargazine, une protéine impliquée dans l'organisation des récepteurs AMPA post-synaptiques au niveau des synapses centrales. Cette similitude de structure avec la stargazine suggère que la clarine 1 pourrait aussi avoir un rôle au niveau de la synapse des CCI. Nous avons ici caractérisé les défauts structurels et fonctionnels des synapses à ruban de CCI, chez des souris présentant une délétion spécifique des cellules ciliées, du gène de la clarine 1.

## **Résultats**

- La délétion spécifique de la clarine 1 (KO conditionnel) dans les cellules ciliées entraîne une surdité profonde avec des oto-émissions préservées. La morphologie des stéréocils reste intacte jusqu'à un stade tardif.
- Au niveau des CCI dépourvues de clarine 1, l'amplitude, la cinétique et la dépendance au voltage des courants calciques sont affectées. L'efficacité de l'exocytose est réduite.
- Le réseau d'actine-F synaptique et l'agrégation des canaux calciques Cav1.3 au ruban sont anormaux chez les KO conditionnel pour la clarine 1.
- Des expériences d'interactions protéiques suggèrent que la clarine 1 interagit avec la sous-unité Cav1.3 via la sous-unité régulatrice  $\beta 2$  et l'harmonine (une protéine d'échafaudage contenant plusieurs domaines PDZ).
- La ré-expression de la clarine 1 dans le KO conditionnel, à l'aide de vecteurs viraux (AAV) injectés dans la cochlée, permet de restaurer la fonction auditive. Au niveau cellulaire, on retrouve une organisation normale du réseau d'actine-F et des canaux calciques Cav1.3 ainsi qu'une exocytose normale.

## **Conclusion**

Notre étude démontre le rôle important de la clarine 1 dans l'organisation et le maintien des stéréocils à l'apex des cellules ciliées mais aussi dans l'organisation des zones synaptiques des CCI. Cette protéine interagirait avec le complexe Cav1.3 et l'actine-F.

## CLARIN-1 IS AN ESSENTIAL ORGANIZER OF THE AUDITORY HAIR CELL RIBBON SYNAPSES

Didier Dulon<sup>a,b,1,2</sup>, Samantha Papal<sup>a,c,d</sup>, Alice Emptoz<sup>a,c,d</sup>, Matteo Cortese<sup>a,c,d</sup>, Philippe F.Y. Vincent<sup>a,b</sup>, Aziz Tlili<sup>a,c,d</sup>, Yohan Bouleau<sup>a,b</sup>, Vincent Michel<sup>a,c,d</sup>, Asadollah Aghaie<sup>a,c,d</sup>, Olinda Allegria-Prevot<sup>a,c,d</sup>, Omar Akil, Lawrence Lustig, Paul Avan<sup>f</sup>, Saaid Safieddine<sup>a,c,d</sup>, Aziz El-Amraoui<sup>a,c,d,1,2</sup>, and Christine Petit<sup>a,c,d,e,1,2</sup>

<sup>a</sup>UMRS 1120, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), 75015 Paris, France

<sup>b</sup> Université de Bordeaux, Laboratoire Neurophysiologie de la synapse auditive, Bordeaux Neurocampus, 33076 Bordeaux, France.

<sup>c</sup>Unité de Génétique et Physiologie de l'Audition, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

<sup>d</sup>Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, Complexité du Vivant, 75005 Paris, France

<sup>e</sup>Syndrome de Usher et Autres Atteintes Rétino-Cochléaires, Institut de la Vision, 75012 Paris, France

<sup>f</sup>Laboratoire de Biophysique Sensorielle, Faculté de Médecine, Université d'Auvergne; Biophysique médicale, Centre Jean Perrin, 63000 Clermont-Ferrand, France,

<sup>f</sup>Collège de France, 75005 Paris, France

Short title: Hair cell synaptic defects and clarin-1

Keywords: Usher syndrome, Ca<sub>v</sub>1.3 Ca<sup>2+</sup> channel, AMPA receptors, hearing restoration, adeno-associated virus therapy.

<sup>1</sup> Co-senior authors

<sup>2</sup> Corresponding authors

didier.dulon@inserm.fr; aziz.el-amraoui@pasteur.fr; christine.petit@pasteur.fr

Unité de Génétique et Physiologie de l'Audition, INSERM UMRS 1120, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France

**ABSTRACT**

The role of clarin-1 defective in Usher syndrome type IIIA (USH3A), characterized by progressive deafness and blindness, remains largely unknown. We show here that a hair cell-specific deletion of clarin-1 in mice leads to a late-onset progressive deafness form, with hair cells displaying normal hair bundle structure, but with abnormal presynaptic and postsynaptic organization. Inner hair cells lacking clarin-1 displayed a reduced  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated exocytosis, a loose coupling between  $\text{Ca}_v1.3$   $\text{Ca}^{2+}$  channels and synaptic ribbons, and a disorganization of synaptic F-actin. An expanded distribution of the postsynaptic glutamate receptors GluA2/3 and degeneration of afferent nerve fibers were also observed. Clarin-1 interacts with the  $\text{Ca}_v1.3$   $\text{Ca}^{2+}$  channel complex by binding to the  $\text{Ca}_v1.3$   $\beta 2$  subunit and the PDZ domain-containing protein harmonin (USH1C). Our results show that clarin-1 is required for the clustering of the presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  channels and postsynaptic glutamate receptors at the auditory ribbon synapses.

## INTRODUCTION

At the auditory hair cell ribbon synapses, transmitter release occurs with high temporal precision and reliability to ensure phase-locking and sound-source localization (Palmer and Russell, 1986; Glowatzki and Fuchs, 2002, Safieddine et al. 2012). This synaptic process involves a tight spatial coupling of  $\text{Ca}_v1.3$  L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and synaptic vesicles at the active zones of inner hair cells (IHCs) (Brandt et al., 2003; Brandt et al., 2005; Goutman and Glowatzki, 2007; Vincent et al., 2014).  $\text{Ca}_v1.3$   $\text{Ca}^{2+}$  channels are heteromultimeric complexes composed of a pore-forming ( $\text{Ca}_v\alpha_1$ ) subunit  $\text{Ca}_v1.3$ , and auxiliary ( $\text{Ca}_v\beta_2$  and  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ ) subunits (Brandt et al., 2003; Buraei and Yang, 2010; Neef et al., 2009). It has been shown that the  $\text{Ca}^{2+}$  channel subunit  $\text{Ca}_v\beta_2$  (Neef et al., 2009), the two anchoring/scaffolding proteins bassoon (Jing et al., 2013) and harmonin (Gregory et al., 2011), and the Rab3-interacting molecules (Jung et al., 2015) are required for the clustering of the  $\text{Ca}_v1.3$  channels at the IHC active zones, but the mechanisms controlling the organization of  $\text{Ca}^{2+}$  nanodomains at the sites of vesicular release are still poorly understood.

Clarin-1 is encoded by *CLRN1*, the gene responsible for Usher syndrome type III (USH3, characterized by progressive sensorineural hearing loss, vestibular dysfunction and retinitis pigmentosa) (Adato et al., 2002; Fields et al., 2002). This small tetraspan-like protein (Fig. 1A) is thought to be essential for the assembly of the submembranous actin-skeleton microdomains, which probably accounts for the disorganization of the hair cell stereocilia in clarin-1-deficient mice (Geng et al., 2012). The amino acid sequence of clarin-1 displays some similarity to that of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel subunit protein 2 (CACNG2) stargazin (Adato et al., 2002), a tetraspan protein involved in post-synaptic AMPA receptor trafficking and clustering (Constals et al., 2015; Hafner et al., 2015). Remarkably, clarin-1-deficient mice have increased auditory brainstem response (ABR) thresholds and interwave latencies (Geng et al., 2009), and they display morphological synaptic defects, suggesting that clarin-1 also plays a role at the IHC ribbon synapse (Ogun and Zallochi, 2014; Zallochi et al., 2012).

Here, we investigated the role of clarin-1 at the auditory hair cell ribbon synapses. We produced two mouse mutants lacking all clarin-1 isoforms to obtain an early ubiquitous gene inactivation (*Clrn1*<sup>-/-</sup>, constitutive knockout mice) and a postnatal, hair cell-specific gene inactivation (*Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup>, post-natal conditional knockout mice; see Fig. S1A,B). A comparison of the hair cell defects in the constitutive and the conditional knockout mice led us to conclude that clarin-1 is required to organize the  $\text{Ca}^{2+}$  channel complex at the IHC active zones, through interactions with the anchoring/scaffolding protein harmonin, the  $\text{Ca}^{2+}$  channel subunit  $\text{Ca}_v\beta_2$ , and the F-actin synaptic network.

## RESULTS

**Hearing impairment in *Clrn1*<sup>-/-</sup> and *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice**

*Clrn1*<sup>-/-</sup> mice with ubiquitous deletion of clarin-1 were obtained by crossing *Clrn1*<sup>fl/fl</sup> mice in which exon 4 (common to all clarin isoforms) was floxed, with *PGK-cre*<sup>+/-</sup> mice (Fig. S1A,B). The *Clrn1*<sup>fl/fl</sup> mice were also crossed with *Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice (Caberlotto et al., 2011) to target clarin-1 deletion specifically to hair cells at post-natal stages (*Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice). Since the structural and functional analyses did not differ between *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>, *Clrn1*<sup>+/-</sup>, and *Clrn1*<sup>+/+</sup> mice, these mice were used as controls.

Auditory function was assessed in *Clrn1*<sup>-/-</sup> and *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice from postnatal day 15 (P15), i.e. just after hearing onset, until P54, by recording the ABRs. In *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice, ABR thresholds in response to tone bursts were markedly increased throughout the 5-40 kHz frequency range from P15 onwards, being at 100-115 dB sound pressure level (SPL), compared to 20-40 dB SPL in control mice (Fig. 1B). In addition, distortion-product otoacoustic emissions (DPOAEs), which probe the activity of outer hair cells (OHCs), were absent in these mice (Fig. 1C). By contrast, the ABR threshold increase in *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice was only 10-15 dB SPL on P15, but worsened thereafter, reaching 20-40 dB SPL on P18-P20, and 65-80 dB SPL on P31-P54, across the frequency spectrum (5-40 kHz) (Fig. 1B, Fig. S1C). DPOAE thresholds in these mice were similar to those in control mice until P20 (Fig. 1C), but progressively increased from P22 onwards. On P30, DPOAE thresholds in *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice were 20-30 dB SPL higher than in control mice (Fig. 1C, Fig. S1D).

Morphological analysis of the hair bundle, the mechanosensory antenna of the hair cells, by confocal and scanning electron microscopy in *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice, showed severe abnormalities of the hair-bundle shape throughout the cochlea, in both OHCs and IHCs, from P0 onwards (Fig. 2A-F; Fig. S2A-C). The OHC hair bundles were linear, wavy, hooked in shape, or occasionally split into two or three clumps of stereocilia, rather than having the normal V-shape (Fig. 2A,B,D,E; Fig. S2A). Notably, in OHCs with fragmented hair bundles, the apical surface of the F-actin-labeled cuticular plate was nonhomogeneous and displayed furrows that delineated the regions containing clumped-stereocilia (Fig. 2G). No such anomalies were observed in age-matched *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice: all the OHCs had normal V shaped hair bundles and a normal cuticular plate, regardless of the stage analyzed, from birth until P90 (Fig. 2C,F,G; Fig. S2B). In both *Clrn1*<sup>-/-</sup> and *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice, the coupling between OHCs and the overlying tectorial membrane was preserved, as illustrated by the presence of imprints of the tallest row of stereocilia on the lower surface of the tectorial membrane and the normal distribution of stereocilin (Fig. S2C). On P12, the stereocilia of short row have entirely regressed in both IHC and OHC hair bundles in *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2B,E). At this stage and up to postnatal day 30 (P30), the IHC and OHC hair bundles in *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice still displayed the typical three rows of stereocilia (Fig. 2F). However, the stereocilia of the short row started to regress after P30, and had entirely disappeared by P60, as shown in some IHCs (Fig. S2E). No such changes were observed in control mice of matched age (Fig. 2D, Fig. S2D).

Together, these results show that an early ubiquitous deletion of clarin-1 in mice leads to a disorganization of the cochlear hair-bundles and to the abnormal regression of stereocilia of the short row in older animals. The disappearance of stereocilia in the short row is a feature commonly observed in the hair bundles of mutant mice lacking or losing the tip-links, such as in *USH1* mice defective for *sans* or for the tip-link components *cadherin-23* and *protocadherin-15* (Caberlotto et al. 2011, Pepermans et al. 2014). We therefore explored the distribution of *USH1* proteins in the hair bundles of clarin-1-deficient mice (Fig. 2H, Figs. S2F, S3A-D). In both *Clrn1*<sup>-/-</sup> and *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice on P4-P5, the typical



enrichment in USH1 proteins — myosin VIIa, harmonin, cadherin-23, protocadherin-15, and sans — at the tips of stereocilia was not affected by the absence of clarin-1, nor was the targeting of the USH2 proteins — usherin, ADGRV1, whirlin — to the ankle links of the stereocilia (Figs. 2H, Fig. S3A-D)

### Defective sound-evoked auditory nerve compound action potentials in young *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice

In *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice, the high ABR thresholds with unaffected DPOAEs indicated that the postnatal loss of clarin-1 affected the IHCs and/or their associated primary auditory neurons. We tested the possible defect of IHCs by recording compound action potentials (CAPs) at the cochlear round window in *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice, which reflect the synchronous firing of primary auditory neurons in response to neurotransmitter release at IHC ribbon synapses. In response to 105-dB SPL stimuli, which bypass the activity of OHCs, the CAP latencies displayed a 30% increase ( $1.95 \pm 0.15$  ms, mean  $\pm$  SD in *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice ( $n = 24$ ) as compared to  $1.50 \pm 0.14$  ms in control *Clrn1<sup>fl/f</sup>* mice ( $n = 10$ )  $p < 0.05$ ; (Fig. 1D)) and the CAP amplitudes showed a 75% decrease ( $3.29 \pm 1.7$   $\mu$ V, mean  $\pm$  SD in *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice ( $n = 24$ ) versus  $12.31 \pm 3.98$   $\mu$ V, mean  $\pm$  SD in control *Clrn1<sup>fl/f</sup>* mice ( $n = 10$ ) mice,  $p < 0.05$ ; (Fig. 1D)). These abnormal CAP responses between P15 and P20, when OHC activity was still unaffected, indicated a defect in neurotransmitter release at the IHC synapses.

### Abnormal $Ca^{2+}$ currents and reduced efficiency of $Ca^{2+}$ -triggered synaptic exocytosis in IHCs lacking clarin-1

We investigated the  $Ca^{2+}$  currents and synaptic exocytosis in IHCs by whole-cell patch-clamp recordings (Beurg et al., 2010; Vincent et al., 2014). Synaptic vesicle exocytosis in IHCs is controlled by  $Ca^{2+}$  influx through L-type  $Ca_v1.3$  channels that are clustered in the vicinity of the synaptic ribbons (Brandt et al., 2003; Khimich et al., 2005). Up to P9, i.e. before the onset of hearing, *Clrn1<sup>-/-</sup>* (Fig. 3A) and *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* (Fig. 3D) IHCs displayed normal  $Ca^{2+}$  currents, with amplitudes and densities similar to those of control littermates' IHCs (Table S1.1). As in control mice (Johnson et al., 2005), a transient developmental up-regulation of  $Ca^{2+}$  current density from P6 and P9 was also observed in *Clrn1<sup>-/-</sup>* and *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* IHCs (Fig. 3E, Table S1.1). However, from P13 to P18, i.e. after the onset of hearing,  $Ca^{2+}$  current density gradually declined to steady state levels below P6-values in control mice, whereas this down-regulation was less pronounced in the IHCs of *Clrn1<sup>-/-</sup>* and *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice (Fig. 3E, Table S1.1). On P18, the  $Ca^{2+}$  current density in *Clrn1<sup>-/-</sup>* and *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice was almost twice that in control mice ( $28.1 \pm 2.2$  pA/pF in *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice versus  $13.1 \pm 0.9$  pA/pF in control *Clrn1<sup>fl/f</sup>* mice,  $p < 0.05$ ; Table S1.1). Analysis of the voltage-dependent activation of  $Ca^{2+}$  currents showed a negative shift up to 7 mV in P18-P21 *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice (half-maximum activation voltage  $V_{1/2} = -33.2 \pm 0.5$  mV) relative to the values obtained in control mice ( $V_{1/2} = -26.0 \pm 0.3$  mV;  $p < 0.05$ ; Table S1.1). This negative shift began at P9 (Fig. 3F,G) before the occurrence of significant changes in the  $Ca^{2+}$  current amplitude and density (Fig. 3E, Table S1.1), and then increased over the following days (Fig. 3G; Table S1.1). A similar negative shift was observed also in *Clrn1<sup>-/-</sup>* mice on P9 and P13 (Table S1.1).

In addition, the kinetics of  $Ca^{2+}$  current activation at negative membrane potentials was slower in both *Clrn1<sup>-/-</sup>* (Fig. 3H) and *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* (Fig. 3I) mice from P9 onward. When activated by changes in voltage-steps from -80 mV to -35 mV, the activation time constant of the  $Ca^{2+}$  current was longer in P18 *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice ( $0.81 \pm 0.11$  ms,  $n = 19$  cells) than in control mice ( $0.58 \pm 0.07$  ms,  $n = 10$  cells;  $p < 0.05$ ) (Fig. 3I). The steepness

of the voltage-dependent activation curve was also significantly lower,  $4.2 \pm 0.1$  pA/mV ( $n = 7$  cells) in mutant mice (versus  $5.7 \pm 0.2$  pA/mV ( $n = 8$  cells) in control mice) on P18;  $p < 0.05$ ; Table S1). Furthermore,  $\text{Ca}^{2+}$  currents in the IHCs of the two clarin-1-deficient mouse mutants displayed a faster time-dependent inactivation at P13 and P18 (Fig. 3J), which probably reflects stronger  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation due to a larger current inflow in mutant IHCs (Fig. 3B,D).

Overall, the *Clnr1* constitutive knockout (*Clnr1*<sup>-/-</sup>) and the postnatal, hair cell-specific conditional knockout (*Clnr1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup>) mice display similar sequential changes in the activity and regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in IHCs: an initial modification of their intrinsic conductive properties at P9, and a subsequent slowdown of the down-regulation of their expression after P9.

We then investigated the relationship between  $\text{Ca}^{2+}$  current defects in the absence of clarin-1 and increases in the latencies and thresholds of the auditory nerve responses, by investigating  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered exocytosis in IHCs. Analyses of IHC exocytosis in *Clnr1*<sup>-/-</sup> and *Clnr1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice showed that the  $\text{Ca}^{2+}$  efficiency and the kinetics were normal at P9 (Fig. 4A,C), but decreased from P13 onwards (Fig. 4B,D, Table S1.2). We further characterized the coupling of  $\text{Ca}^{2+}$  influx and exocytosis, by probing exocytosis after increasing the intracellular concentration of the  $\text{Ca}^{2+}$  chelator EGTA. At mature stages, the  $\text{Ca}^{2+}$  channels and synaptic vesicles of mouse IHCs are organized into a nanodomain spatial configuration, which is thought to account for the lack of sensitivity of exocytosis to EGTA in these cells (Brandt et al., 2005). Accordingly, increasing the concentration of intracellular EGTA from 1 to 5 mM did not affect the kinetics of IHC exocytosis in P18 control mice (Fig. 4E, Table S1.2). By contrast, 5 mM intracellular EGTA in the IHCs of P18 *Clnr1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice further decreased the residual low exocytotic responses measured in 1 mM EGTA (Fig. 4E; Table S1.2). Finally, we used flash photolysis of intracellular caged  $\text{Ca}^{2+}$  (Brandt et al., 2003; Vincent et al., 2014) to probe the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of the exocytotic release machinery in IHCs directly, bypassing the contribution of  $\text{Ca}^{2+}$  influx through  $\text{Ca}_v1.3$  channels (Fig. 4F-H). Following UV stimulation, the IHCs of P13 *Clnr1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice had lower instantaneous rates of release than control IHCs (Fig. 4F,G). Indeed, the values of the derivative function (dC/dt) calculated at each point of the exocytotic curves were smaller in *Clnr1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> than in control mice (Fig. 4G; F-test = 4.48;  $p < 0.05$ ), as was the maximum release rate ( $2.9 \pm 0.9$  pF/s,  $n = 10$ , in mutant mice versus  $7.7 \pm 2.5$  pF/s,  $n = 9$ , in control mice;  $p < 0.05$ ). Likewise, the maximum amplitude of exocytosis was significantly reduced in the IHCs of *Clnr1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice ( $474 \pm 29$  fF,  $n = 9$  IHCs, versus  $717 \pm 74$  fF,  $n = 10$  IHCs in controls;  $p < 0.05$ ) (Fig. 4H).

Together these results show that a lack of clarin-1 results in a markedly lower efficiency of  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated exocytosis in IHCs, which can be explained both by an intrinsic defect of the exocytotic machinery, as suggested by the  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging experiments, and a loose coupling between  $\text{Ca}^{2+}$  entry ( $\text{Ca}_v1.3$   $\text{Ca}^{2+}$  channels) and the synaptic machinery, as indicated by the worsening effect caused by a high concentration of intracellular EGTA.

### Clarin-1 is essential for the tight clustering of $\text{Ca}_v1.3$ channels at the IHC ribbon synapse

On P21, IHCs of *Clnr1*<sup>-/-</sup> and *Clnr1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice had a normal distribution of otoferlin and ribbons in their basolateral synaptic region (Fig. 5A, Fig. S4A). At this mature stage, the number of ribbons per IHC (mean  $\pm$  SEM) in the apical-mid turn of the cochlea, the region in which synaptic exocytosis was studied (Figs. 3, 4), were similar in *Clnr1*<sup>-/-</sup> ( $16 \pm 2.2$ ,  $n = 37$  IHCs), *Clnr1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> ( $15 \pm 1.5$ ,  $n = 72$  IHCs), and control ( $15 \pm 2.1$ ,  $n = 72$  IHCs) mice (Fig. 5A). Ultrastructural analyses showed that the IHCs of *Clnr1*<sup>-/-</sup> P15 mice

displayed immature features, including a high number of spherical ribbons and the persistence of axosomatic efferent synaptic contacts (Fig. 5B, Fig. S4B). Only 60% of the ribbons (19 of the 31 ribbons examined) had a plate-like mature shape similar to that observed in control mice of the same age (Fig. 5C). On the following days, the number of immature ribbons observed in *Clrn1*<sup>-/-</sup> IHCs decreased from 40% ( $n = 31$ ) at P15 to less than 20 % ( $n = 17$ ) at P28, therefore reaching near normal values (Fig. 5C). The shapes of the synaptic ribbons in IHCs of *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice were indistinguishable from those of control mice, both at P15 and P28 (Fig. 5C). On P28, the vast majority of the ribbons (39 of 42, 93 %) had the plate-like shape typical of mature synapses (Fig. 5C).

The spatial relationship between the ribbon and Cav1.3 channels was explored by studying their overlapping distribution area at the IHC active zones. At P9, the number of Cav1.3- and ribeye -(the major protein of the ribbon) coimmunoreactive patches per IHC was similar in *Clrn1*<sup>-/-</sup>, *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup>, and control mice (Fig. 5D). Furthermore, the ratio of the coimmunoreactive area to the Cav1.3 immunoreactive area at each P9 active zone did not differ between *Clrn1*<sup>-/-</sup>, *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup>, and control mice (Fig. 5F). By contrast, from P13, this ratio was reduced in IHCs of *Clrn1*<sup>-/-</sup> and *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice (Fig. 5E, F), even though the total number of Cav1.3- and ribeye- coimmunoreactive patches was still similar to that in control mice (Fig. 5D). In P21 *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> IHCs, the colocalization ratio was about  $30 \pm 6$  % ( $n = 205$  ribbons) of the ratio in control IHCs ( $n = 181$  ribbons;  $p < 0.05$ ). In addition, the mean size of ribeye-immunoreactive ribbons was much smaller in *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice than in controls (estimated by Imaris 3D-surface area determinations:  $1.77 \pm 0.07 \mu\text{m}^2$ ,  $n = 146$  IHCs, in P13 *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice, versus  $2.77 \pm 0.09 \mu\text{m}^2$ ,  $n = 273$  IHCs, in controls,  $p < 0.05$ ; Fig. 5G). Conversely, the mean size of the Cav1.3-immunoreactive patches was almost 40% larger in the IHCs of *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice ( $3.33 \pm 0.17 \mu\text{m}^2$ ,  $n = 146$  IHCs, in P13 *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice, versus  $2.1 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$ ,  $n = 273$  IHCs, in controls;  $p < 0.05$ ; Fig. 5G).

Owing to the observed defects in F-actin-labeled hair cell structures, i.e. the stereocilia and cuticular plate, in *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice, we explored the organization of the F-actin subcortical network in the IHC ribbon synaptic zone. This synaptic F-actin network is essential for maintaining a tight spatial organization of Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels at the active zones (Vincent et al., 2015). In P9 control IHCs, an intense continuous submembranous F-actin cortical network, closely associated with otoferlin (a vesicular protein proposed to act as a putative Ca<sup>2+</sup> sensor regulating vesicle fusion in hair cells, Roux et al, 2006; Beurg et al., 2010), ribeye (a component of the ribbon cytomatrix), and Cav1.3 co-immunoreactive spots, was observed (Fig. 5H). By P13, F-actin extended further underneath the IHC plasma membrane, forming dense intracellular cylindrical meshes with diameters of 0.5 to 1  $\mu\text{m}$  (Vincent et al., 2015). Staining for F-actin overlapped with that for otoferlin, and each F-actin bundle was associated with one or two ribeye- and Cav1.3- coimmunoreactive patches (Fig. 5H). In P9 *Clrn1*<sup>-/-</sup> IHCs, despite the presence of normal amounts of otoferlin, ribeye, and Cav1.3, the continuous submembranous F-actin network was disrupted (Fig. 5H, right panel). On P13, the dense intracellular subcortical mesh network of F-actin was clearly disorganized in the IHCs of *Clrn1*<sup>-/-</sup> and *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice (Fig. 5H, right panel and data not shown).

Therefore, the loss of clarin-1 in mutant IHCs leads to a severe disorganization of the synaptic F-actin network, and large de-clustered synaptic domains of Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in the vicinity of the attached ribbons.

### Clarin-1 is associated with the L-type Ca<sup>2+</sup> channel complex

We asked whether clarin-1 may interact with Cav $\alpha_1$  (aa 1-2203, NP\_058994.1), the Cav1.3 pore-forming subunit, or Cav $\beta_2$  (aa 2-604, NP\_4466303.1), the Cav1.3 auxiliary subunit. To this purpose, we carried out co-immunoprecipitation assays on protein extracts

from cotransfected HEK293 cells (Fig. 6A). A significant interaction was observed between clarin-1 and  $\text{Ca}_v\beta_2$ , but not with  $\text{Ca}_v\alpha_1$  (Fig. 6A). This interaction was confirmed by pull-down experiments using two overlapping clarin-1 fusion proteins, containing either the N-terminal region (Clrn1-N, aa 1-136) encompassing the first two transmembrane domains (TM1 and TM2), or the C-terminal region (Clrn1-C, aa 121-232) encompassing TM3 and TM4 (Fig. 6A). Following incubation with protein extracts from HEK293 cells producing GFP-tagged  $\text{Ca}_v\beta_2$ , GST-tagged Clrn1-N and Clrn1-C bound to GFP-tagged  $\text{Ca}_v\beta_2$ , whereas GST alone did not (Fig. 6A).

Also, protein extracts from transfected HEK293 cells producing mCherry-tagged clarin-1, alone or together with GFP-tagged  $\text{Ca}_v\beta_2$ , were incubated with Flag-tagged BAID ( $\beta$  and  $\alpha$ -interaction domain of  $\text{Ca}_v\alpha_1$ , aa 406-576, NP\_058994.1), the region of  $\text{Ca}_v\alpha_1$  interacting with  $\text{Ca}_v\beta_2$  (Fig. 6B). Analysis of bound proteins to Flag-tagged BAID immobilized on anti-Flag magnetic beads showed that Flag-BAID immunoprecipitated mCherry-tagged clarin-1 only in the presence of GFP-tagged  $\text{Ca}_v\beta_2$  (Fig. 6B), which is consistent with the formation of a tripartite complex of  $\text{Ca}_v\alpha_1$ ,  $\text{Ca}_v\beta_2$ , and clarin-1.

We then investigated the possible involvement of other IHC synaptic proteins in the protein complex involving  $\text{Ca}_v1.3$  and clarin-1. The  $\text{Ca}_v\beta$  subunit has been shown to recruit regulatory factors, modulating  $\text{Ca}_v1.3$  channel gating properties (Hidalgo and Neely, 2007). Given that clarin-1 contains a C-terminal class-II PDZ binding motif (PBM type II, Fig. 6A), we searched for a possible interaction with the PDZ domain-containing protein harmonin, defective in Usher syndrome type IC (Fig. 6C), which has been shown to constrain the number of available  $\text{Ca}_v1.3$  at the IHC active zones (Gregory et al., 2011) and to control their voltage-dependent facilitation (Gregory et al., 2013). Upon incubation with protein extracts of transfected HEK293 cells producing the myc-tagged harmonin b protein, the longest splice form of harmonin (aa 2-852, AAM44072.1), GST-tagged Clrn1-C, but not GST alone, bound to harmonin (Fig. 6C). We also found that GST-tagged harmonin a (aa 2-548, NP\_076138.1) binds to the GFP-tagged  $\text{Ca}_v\beta_2$  (Fig. 6D). The coincubation of GST-tagged clarin-1 with GFP-tagged  $\text{Ca}_v\beta_2$  in the presence of various concentrations of myc-tagged harmonin b increased  $\text{Ca}_v\beta_2$ -clarin-1 binding (Fig. 6E), indicating a promoting and/or stabilizing effect of harmonin on the  $\text{Ca}_v\beta_2$ -clarin-1 interaction.

These results demonstrate that clarin-1 interacts with the submembrane auxiliary subunit  $\text{Ca}_v\beta_2$  and the scaffold protein harmonin, two proteins of the  $\text{Ca}_v1.3$  channel complex (Fig. 6F).

*Clrn1* is also expressed in the primary auditory neurons synapsing on IHCs (Adato et al., 2002; Geller et al., 2009). To determine whether the absence of clarin-1 also affected the post-synaptic auditory nerve fibers, we recorded electrically evoked brainstem responses (EEBRs), by bypassing the IHC synapses and stimulating directly the auditory primary neurons. No significant EEBR waves were evoked in *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice, indicating the occurrence of strong postsynaptic defect in the absence of clarin-1 (Fig. 7A). Transmission electron microscopy (TEM) analysis indeed showed marked swelling of the dendrites and a substantial loss of primary auditory neurons in these mice (Fig. 7B,C). In *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice, which lack clarin-1 only in the hair cells, EEBR waves were of smaller amplitude than in control mice, and the peaks of waves II (EII) and III (EIII) were significantly delayed (Fig. 7A), suggesting that the specific postnatal loss of clarin-1 in hair cells has impacted on the function of the primary auditory neurons. By immunofluorescence analysis in these mice we observed that the distribution of the postsynaptic GluA2/3 AMPA receptors on the dendrites of primary auditory neuron fibers was enlarged (Fig. 7D; Fig. S4C) and that some fibers beneath the IHC synapses degenerated (Fig. 7E). The expansion of the postsynaptic region

and the dendrite loss were confirmed by TEM analysis (Fig. 7B), although no significant loss of primary auditory neurons in these *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice was detected (Fig. 7C).

Our results show that the postnatal hair cell-specific removal of clarin-1, causing a major disorganization of the presynaptic Ca<sub>v</sub>1.3 channel complex in the IHC active zone, also results in a disorganization of the postsynaptic afferent nerve terminals.

### Hearing rescue of clarin-1-deficient mice by gene transfer in IHCs

A recombinant adeno-associated virus (AAV) carrying the cDNA encoding the mouse clarin-1 (followed by an IRES-GFP sequence for the visualization of transduced cells) (AAV2/8-*Clrn1*-IRES-GFP) was microinjected through the round window membrane of the cochlea on P1–P3 in both *Clrn1<sup>-/-</sup>* and *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice (see methods). Viral transduction was observed in 90% to 100% of IHCs on P14–P20 (Fig. 8A). On P20 and P27, audiometric tests showed a significant hearing rescue of *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice. For the injected ears, the ABR thresholds at 10 kHz and 20 kHz were 20 dB and 38 dB, respectively (similar to those of control mice), as compared to 67 dB and 70 dB for the not injected ears ( $p < 0.001$  for each comparison, Fig 8B). In *Clrn1<sup>-/-</sup>* mice, the injection of AAV2/8-*Clrn1*-IRES-GFP resulted in only a mild recovery of hearing sensitivity in the injected ear, the ABR thresholds at 10 kHz and 20 kHz were 83 dB and 98 dB, respectively, as compared to 99 dB and 108 dB in the not injected ears ( $p < 0.01$  for each comparison, Fig 8B). Structural analyses in *Clrn1<sup>-/-</sup>* mice showed that the hair bundles were still misshaped both in the injected ear and the contralateral (not injected) ear (Fig. 8C), which probably accounts for the limited effect of the viral transduction on hearing. By contrast, the characteristics of Ca<sup>2+</sup> currents (Fig. 8D, left panel), the kinetics (Fig. 8D, middle panel), and Ca<sup>2+</sup> efficiency of synaptic exocytosis (Fig. 8D, right panel), and the clustering of the Ca<sub>v</sub>1.3 channels (Fig. 8E) in the active zone in IHCs of P15–P18 *Clrn1<sup>-/-</sup>* mice injected with AAV2/8-*Clrn1* were identical to those of control IHCs (Table S2). These findings demonstrate that the re-expression of clarin-1 in the IHCs of clarin-1-deficient mice early in post-natal days prevents the occurrence of the synaptic defects.

## DISCUSSION

We show here that clarin-1 is a component essential for the morpho-functional characteristics—of both the hair bundle of auditory hair cells, IHCs and OHCs and the IHC synapses.

### **Clarin-1 is required for actin filament organization at IHC ribbon synapses**

The lack of clarin-1 resulted in a marked disorganization of the synaptic subcortical F-actin network at the IHC ribbon synapse. Of note, the absence of clarin-1 also disorganizes F-actin at the apical surface of the cuticular plate in hair cells with deformed bundles. In HEK293 cells, clarin-1 has been shown to form microdomains at the plasma membrane and induce actin organization at lamellipodia protrusions (Tian et al., 2009). These results suggest clarin-1 as an essential organizer of the hair cell actin cytoskeleton. How the disorganization of the F-actin could influence the synaptic organization of  $\text{Ca}_v1.3$  channels in IHCs? F-actin cytoskeleton dynamic changes are known to influence the organization of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels and the secretory machinery at the plasma membrane in chromaffin cells (Gutierrez, 2012; Torregrosa-Hetland et al., 2010). Direct interaction between  $\text{Ca}_v\beta2$  and F-actin has been shown to foster an increase in the number of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels at the plasma membrane of cardiomyocytes (Stölting et al., 2015). The coiled-coil and PST domains of harmonin-b associates with and bundles F-actin (Boeda et al., 2002). Because disrupting F-actin with latrunculin-A in wild-type IHCs leads to an expanded distribution of  $\text{Ca}_v1.3$   $\text{Ca}^{2+}$  channels (Vincent et al., 2015) similar to that in IHC active zones lacking clarin-1, it is tempting to propose that clarin-1, possibly through its interaction with harmonin and  $\text{Ca}_v\beta2$ , regulates F-actin and  $\text{Ca}^{2+}$  channels trafficking at the ribbon active zone.

### **Clarin-1 is required for the tight clustering of $\text{Ca}_v1.3$ channels at IHC ribbon synapses**

Clarin-1 defect does not impair the targeting of the synaptic ribbons and  $\text{Ca}_v1.3$  channels to IHC active zones. However, the larger  $\text{Ca}_v1.3$ -immunoreactive domains and the decreased colocalization with the IHC ribbons that occur in the absence of clarin-1, indicate that the protein acts to confine  $\text{Ca}_v1.3$  channels within the active zones (see schematic drawing in Fig. S5). Clarin-1, through its direct binding to the PDZ-domain-containing protein harmonin, could control the distribution of  $\text{Ca}_v1.3$  channels at the IHC synaptic active zones *via* the constraint effect that harmonin exerts on the number of available  $\text{Ca}_v1.3$  channels in IHCs (Gregory et al., 2011; Gregory et al., 2013). In addition, through its interaction with the auxiliary subunit  $\text{Ca}_v\beta2$ , clarin-1 is likely to control the positioning of the  $\text{Ca}_v1.3$  channels at the IHC active zones, as IHCs of  $\text{Ca}_v\beta2$ -deficient mice showed decreased synaptic clustering of  $\text{Ca}_v1.3$  channels (Neef et al., 2009). Experiments tracking the mobility of  $\text{Ca}_v1.4$   $\text{Ca}^{2+}$  channels with quantum dots at the ribbon synapse of salamander photoreceptors showed that the  $\text{Ca}_v1.4$   $\text{Ca}^{2+}$  channels are mobile, but they are confined beneath the ribbon by molecular scaffolds and actin to ensure high efficiency of neurotransmitter release (Mercer et al., 2011). In hippocampal synapses, presynaptic scaffolds at the cytomatrix active zones also determine the local mobility of  $\text{Ca}^{2+}$  channels, a mechanism known to underlie  $\text{Ca}^{2+}$  channel cooperativity and to strengthen transmitter release (Schneider et al., 2015). A similar process probably takes place at the IHC active zones, where clarin-1, harmonin and  $\text{Ca}_v\beta2$  form a molecular platform associated with F-actin. This platform would confine the  $\text{Ca}_v1.3$   $\text{Ca}^{2+}$  channels at the IHC active zone, thus allowing an optimal  $\text{Ca}^{2+}$  channels' cooperativity to synchronize vesicular release and strengthen synaptic transmission.

### **The lack of clarin-1 results in postsynaptic defects**

The lack of clarin-1 in hair cells only (*Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice) causes also an abnormal distribution of GluA2/3 glutamate receptors. This postsynaptic defect was more

pronounced in *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice, which lack clarin-1 in both the presynaptic and postsynaptic membranes, leading to significant loss of afferent fibers. Of note, clarin-1 has a sequence similarity to stargazin (Adato et al., 2002), a four-transmembrane protein that has been shown to interact with the PDZ-domain-containing protein PSD-95 at excitatory postsynaptic densities and to govern AMPA receptors clustering and synaptic strength of hippocampal neurons (Constals et al., 2015; Hafner et al., 2015). Through a mechanism similar to stargazin, clarin-1 may control the diffusion of GluA2/3 receptors at the postsynaptic densities of the auditory nerve fibers.

The occurrence of postsynaptic defects in the hair cell specific *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> conditional knock out raises the question as to their origin. Could they be simply a consequence of the presynaptic disorganization of the Ca<sup>2+</sup> channel clusters? Ribbon anchorage defect in the IHC lacking the presynaptic cytomatrix bassoon resulted in a larger number of extrasynaptic Ca<sup>2+</sup> channels without affecting the clustering of GluA2/3 receptors (Jing et al., 2013). This precludes changes in the organization of the presynaptic Ca<sub>v</sub>1.3 channels alone as the main cause for the postsynaptic defects in clarin-1 mutants. The reduced exocytosis and Ca<sup>2+</sup> efficacy of IHC synapses in clarin-1-deficient mice also precludes the possibility of excessive glutamate release leading to neuronal degeneration (Pujol and Puel, 1999). Of note, clarin-1 is expressed in both hair cells and the primary auditory neurons (Adato et al., 2002; Geller et al., 2009), and forms dimers and multimers when expressed in cell cultures (Isosomppi et al., 2009). Clarin-1, trans-dimers and/or interacting with yet unidentified extracellular proteins, probably is involved in the formation and maintenance of extracellular trans-synaptic complexes that ensure correct coupling between presynaptic and postsynaptic membranes across the IHC synaptic cleft (see Fig. S5).

#### **Onset and severity of the hair bundle and synaptic defects: gene therapy rescue**

The misshapen hair-bundles throughout the cochlea of mutant mice lacking exon 1 (Geller et al., 2009; Geng et al., 2009) or exon 4 (this study) of *Clrn1* point to a key role of clarin-1 in hair bundle morphogenesis. These morphological defects are consistent with impaired DPOAEs and mechano-electrical transduction impairment, resulting in a severe to profound deafness in mice lacking clarin-1 from P14 onwards. Clarin-1 is also an essential hair bundle protein in zebrafish hair cells (Ogun and Zallocchi, 2014; Gopal et al., 2015). In humans, despite a number of disabling *CLRN1* mutations identified in USH3 patients, the audiometric tests indicate that the hair cells seem to differentiate and function normally for long periods of time (Ebermann et al., 2007; Ness et al., 2003). Different clarin-1 isoforms may compensate for each other in humans (Vastinsalo et al., 2011), but not in mice and zebrafish. A functional redundancy between the three paralogous *CLRN* genes (*CLRN1*, *CLRN2*, and *CLRN3*) also could possibly account for the persistence of hearing in children with USH3.

Cochlear implants are currently the only treatment available for severe to profound deafness. These prosthetic electrode arrays bypass the hair cells and stimulate directly the primary auditory neurons. Studies in USH1 patients have shown that the early implantation of these devices results in better hearing performance and speech perception (Pennings et al., 2006). The absent and delayed EEBR waves in *Clrn1*<sup>-/-</sup> and *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice, respectively, and the significant loss of the primary auditory neurons in *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice if extrapolated to humans would imply a probable decrease in the performance of cochlear implants over time in elderly USH3 patients. Long-term follow-up of USH patients according to the three clinical subtypes (USH1, USH2, USH3) is still lacking, great variability and decreased performances have been reported for cochlear implants in USH3 patients (C. Moller, personal communication). Interestingly, we found that viral gene therapy of clarin-1 in hair cells prevented the occurrence of IHC synaptic defects and halted the postnatal hearing loss in *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice.

A gene therapy approach addressing hair cells and associated neurons would prevent the loss of the primary auditory neurons preserving neuronal transmission to allow optimal hearing rehabilitation in USH3 patients.



## MATERIAL AND METHODS

Detailed methods are available in the supplemental experimental procedures.

### Generation of clarin-1-deficient mice

All the experiments on animals were carried out according to protocols approved by the Animal Use Committees of INSERM, and Institut Pasteur (CETEA-2014-0032). To engineer clarin-1-deficient mice, we used the cre-lox system to delete *Clrn1* exon 4 (see Fig. S1B,C). The *Clrn1<sup>fl/fl</sup>* mice carrying the LoxP sites on both alleles were crossed with *PGK-cre<sup>+/-</sup>* mice to obtain a precocious and ubiquitous absence of clarin-1 (*Clrn1<sup>-/-</sup>* mice), and with *Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice (Caberlotto et al., 2011) to specifically target clarin-1 deletion to hair cells at post-natal stages (*Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice).

### Expression vectors, antibodies and protein-protein interactions

Expression vectors containing full-length or fragments of the murine clarin-1, rat Cav1.3  $\alpha_1$ ,  $\beta_2$  cDNAs, and antibodies against USH proteins (Sahly et al., 2012), otoferlin, Cav1.3 channel complex, and ribeye (Khimich et al., 2005; Roux et al., 2006) were used as described in the supplemental experimental procedures. For the binding assays, bound proteins were collected in 30  $\mu$ l of 2x concentrated SDS sample buffer, and analysed by western blot with the ECL chemiluminescence detection system (Pierce).

### Confocal immunofluorescence and electron microscopy

Ribbon synapses and/or Cav1.3 immunoreactive spots were analyzed as previously described (Khimich et al., 2005; Roux et al., 2006), using 3D reconstructions of all z-stack confocal sections containing the whole IHC-labeled cells. For ultrastructural analyses, ultrathin sections were transferred to formvar-coated single-slot grids, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a Jeol1200EX electron microscope (Pasteur, Imageopole) (Roux et al., 2006; Vincent et al., 2014). For scanning electron microscopy, samples were processed using the osmium tetroxide/thiocarbohydrazide (OTOTO) method, as previously described (Kamiya et al., 2014).

### Auditory function and hair cell electrophysiology

Auditory brainstem responses (ABRs), compound action potentials (CAPs) and distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) were recorded in anaesthetized mice, and analyzed as previously described (Kamiya et al., 2014).

For IHC recordings, Ca<sup>2+</sup> currents and real-time changes in membrane capacitance ( $\Delta C_m$ ) were recorded in the whole-cell voltage-clamp configuration using 3-5 M $\Omega$  resistance micropipettes with an EPC 10 amplifier and Patchmaster software (Heka Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Germany). For intracellular Ca<sup>2+</sup> uncaging experiments, IHCs were loaded with 10 mM DM-nitrophen as previously described (Vincent et al., 2014).

### Statistical analysis

For in vivo recordings, statistical significance of the differences observed was tested with Student's *t* test, two-way analysis of variance coupled to the Bonferroni post-hoc test (2-way ANOVA) or two-tailed unpaired *t* test with Welch's correction using the Prism software (GraphPad, La Jolla, CA). For ex-vivo recordings, the data (expressed as mean  $\pm$  SEM (SD pour Paul ?)) were analyzed with Origin (Microcal, Northampton, MA) and Igor software (Wavemetrics, Portland, OR). Statistical significances are indicated on the figures. (ns), (\*),

(\*\*), and (\*\*\*) denote non significant ( $p > 0.05$ ),  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.001$ , respectively

**Author contributions:** CP, DD, and AE designed the research; SP, MC, AEm, and PV equally contributed to the research data: SP and MC did the biochemical work, contributed to immunofluorescence data and handled all mice used, AEm performed gene transfer in the inner ear and follow-up of the mice, and PV carried out the electrophysiological recordings. DD and YB performed and analyzed data on IHC synaptic function; PA performed the audiologic experiments and analyzed the data, OA and LL helped with gene transfer; AT, VM, AL, AA, OA-P, and SS performed research, and AE, SS, and CP analyzed data; CP, DD, and AE wrote the paper.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Jean-Pierre Hardelin for critical reading of the manuscript. We also thank Marion Rincel for analyzing part of the uncaged calcium experiments. This work was supported by ERC grant 294570-hair bundle, the European Union Seventh Framework Programme, under grant agreement HEALTH-F2-2010-242013 (TREATRUSH), LHW-Stiftung, FAUN Stiftung (Suchert Foundation), LABEX Lifesenses [ANR-10-LABX-65], and a grant from the *Fondation Agir Pour l'Audition* (to DD).

**REFERENCES**

- Adato, A., Vreugde, S., Joensuu, T., Avidan, N., Hamalainen, R., Belenkiy, O., Olender, T., Bonne-Tamir, B., Ben-Asher, E., Espinos, C., *et al.* (2002). USH3A transcripts encode clarin-1, a four-transmembrane-domain protein with a possible role in sensory synapses. *Eur J Hum Genet* 10, 339-350.
- Akil, O., Seal, R.P., Burke, K., Wang, C., Alemi, A., During, M., Edwards, R.H., and Lustig, L.R. (2012). Restoration of hearing in the VGLUT3 knockout mouse using virally mediated gene therapy. *Neuron* 75, 283-293.
- Beurg, M., Michalski, N., Safieddine, S., Bouleau, Y., Schneggenburger, R., Chapman, E.R., Petit, C., Dulon, D. (2010). Control of Exocytosis by Synaptotagmins and Otoferlin in Auditory Hair Cells. *J Neurosci* 30, 13281-13290.
- Brandt, A., Khimich, D., and Moser, T. (2005). Few CaV1.3 channels regulate the exocytosis of a synaptic vesicle at the hair cell ribbon synapse. *J Neurosci* 25, 11577-11585.
- Brandt, A., Striessnig, J., and Moser, T. (2003). CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 23, 10832-10840.
- Buraei, Z., and Yang, J. (2010). The ss subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Physiol Rev* 90, 1461-1506.
- Caberlotto, E., Michel, V., Foucher, I., Bahloul, A., Goodyear, R.J., Pepermans, E., Michalski, N., Perfettini, I., Alegria-Prevot, O., Chardenoux, S., *et al.* (2011). Usher type 1G protein sans is a critical component of the tip-link complex, a structure controlling actin polymerization in stereocilia. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 5825-5830.
- Constals, A., Penn, A.C., Compans, B., Toulme, E., Phillipat, A., Marais, S., Retailleau, N., Hafner, A.S., Coussen, F., Hossy, E., and Choquet, D. (2015). Glutamate-induced AMPA receptor desensitization increases their mobility and modulates short-term plasticity through unbinding from Stargazin. *Neuron* 85, 787-803.
- Ebermann, I., Wilke, R., Lauhoff, T., Lubben, D., Zrenner, E., and Bolz, H.J. (2007). Two truncating USH3A mutations, including one novel, in a German family with Usher syndrome. *Mol Vis* 13, 1539-1547.
- Fields, R.R., Zhou, G., Huang, D., Davis, J.R., Moller, C., Jacobson, S.G., Kimberling, W.J., and Sumegi, J. (2002). Usher syndrome type III: revised genomic structure of the USH3 gene and identification of novel mutations. *Am J Hum Genet* 71, 607-617.
- Geller, S.F., Guerin, K.I., Visel, M., Pham, A., Lee, E.S., Dror, A.A., Avraham, K.B., Hayashi, T., Ray, C.A., Reh, T.A., *et al.* (2009). CLRN1 is nonessential in the mouse retina but is required for cochlear hair cell development. *PLoS Genet* 5, e1000607.
- Geng, R., Geller, S.F., Hayashi, T., Ray, C.A., Reh, T.A., Birmingham-McDonogh, O., Jones, S.M., Wright, C.G., Melki, S., Imanishi, Y., *et al.* (2009). Usher syndrome IIIA gene

clarin-1 is essential for hair cell function and associated neural activation. *Hum Mol Genet* 18, 2748-2760.

Geng, R., Melki, S., Chen, D.H., Tian, G., Furness, D.N., Oshima-Takago, T., Neef, J., Moser, T., Askew, C., Horwitz, G., *et al.* (2012). The mechanosensory structure of the hair cell requires clarin-1, a protein encoded by Usher syndrome III causative gene. *J Neurosci* 32, 9485-9498.

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

Gopal, S.R., Chen, D.H., Chou, S.W., Zang, J., Neuhauss, S.C., Stepanyan, R., McDermott, B.M., Jr., and Alagramam, K.N. (2015). Zebrafish Models for the Mechanosensory Hair Cell Dysfunction in Usher Syndrome 3 Reveal That Clarin-1 Is an Essential Hair Bundle Protein. *J Neurosci* 35, 10188-10201.

Goutman, J.D., and Glowatzki, E. (2007). Time course and calcium dependence of transmitter release at a single ribbon synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 16341-16346.

Gregory, F.D., Bryan, K.E., Pangrsic, T., Calin-Jageman, I.E., Moser, T., and Lee, A. (2011). Harmonin inhibits presynaptic Ca(v)1.3 Ca(2+) channels in mouse inner hair cells. *Nat Neurosci* 14, 1109-1111.

Gregory, F.D., Pangrsic, T., Calin-Jageman, I.E., Moser, T., and Lee, A. (2013). Harmonin enhances voltage-dependent facilitation of Cav1.3 channels and synchronous exocytosis in mouse inner hair cells. *J Physiol* 591, 3253-3269.

Gutierrez, L.M. (2012). New insights into the role of the cortical cytoskeleton in exocytosis from neuroendocrine cells. *Int Rev Cell Mol Biol* 295, 109-137.

Hafner, A.S., Penn, A.C., Grillo-Bosch, D., Retailleau, N., Poujol, C., Philippat, A., Coussen, F., Sainlos, M., Opazo, P., and Choquet, D. (2015). Lengthening of the Stargazin Cytoplasmic Tail Increases Synaptic Transmission by Promoting Interaction to Deeper Domains of PSD-95. *Neuron* 86, 475-489.

Hanley, J.G. (2014). Actin-dependent mechanisms in AMPA receptor trafficking. *Front Cell Neurosci* 12, 381.

Hidalgo, P., and Neely, A. (2007). Multiplicity of protein interactions and functions of the voltage-gated calcium channel beta-subunit. *Cell Calcium* 42, 389-396.

Isosomppi, J., Vastinsalo, H., Geller, S.F., Heon, E., Flannery, J.G., and Sankila, E.M. (2009). Disease-causing mutations in the CLRN1 gene alter normal CLRN1 protein trafficking to the plasma membrane. *Mol Vis* 15, 1806-1818.

Jing, Z., Rutherford, M.A., Takago, H., Frank, T., Fejtova, A., Khimich, D., Moser, T., and Strenzke, N. (2013). Disruption of the presynaptic cytomatrix protein bassoon degrades ribbon anchorage, multiquantal release, and sound encoding at the hair cell afferent synapse. *J Neurosci* 33, 4456-67.

- Johnson, S.L., Marcotti, W., and Kros, C.J. (2005). Increase in efficiency and reduction in Ca<sup>2+</sup> dependence of exocytosis during development of mouse inner hair cells. *J Physiol* 563, 177-191.
- Jung, S., Oshima-Takago, T., Chakrabarti, R., Wong, A.B., Jing, Z., Yamanbaeva, G., Picher, M.M., Wojcik, S.M., Göttfert, F., Predoehl, F., *et al.* (2015) Rab3-interacting molecules 2 $\alpha$  and 2 $\beta$  promote the abundance of voltage-gated CaV1.3 Ca<sup>2+</sup> channels at hair cell active zones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E314-3149.
- Kamiya, K., Michel, V., Giraudet, F., Riederer, B., Foucher, I., Papal, S., Perfettini, I., Le Gal, S., Verpy, E., Xia, W., *et al.* (2014). An unusually powerful mode of low-frequency sound interference due to defective hair bundles of the auditory outer hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 9307-9312.
- Khimich, D., Nouvian, R., Pujol, R., Tom Dieck, S., Egner, A., Gundelfinger, E.D., and Moser, T. (2005). Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature* 434, 889-894.
- Kim, C.H., Lisman, J.E. (1999). A role of actin filament in synaptic transmission and long-term potentiation. *J Neurosci* 19, 4314-24.
- Mercer, A.J., Chen, M., and Thoreson, W.B. (2011). Lateral mobility of presynaptic L-type calcium channels at photoreceptor ribbon synapses. *J Neurosci* 31, 4397-4406.
- Neef, J., Gehrt, A., Bulankina, A.V., Meyer, A.C., Riedel, D., Gregg, R.G., Strenzke, N., and Moser, T. (2009). The Ca<sup>2+</sup> channel subunit beta2 regulates Ca<sup>2+</sup> channel abundance and function in inner hair cells and is required for hearing. *J Neurosci* 29, 10730-10740.
- Ness, S.L., Ben-Yosef, T., Bar-Lev, A., Madeo, A.C., Brewer, C.C., Avraham, K.B., Kornreich, R., Desnick, R.J., Willner, J.P., Friedman, T.B., and Griffith, A.J. (2003). Genetic homogeneity and phenotypic variability among Ashkenazi Jews with Usher syndrome type III. *J Med Genet* 40, 767-772.
- Ogun, O., and Zallocchi, M. (2014). Clarin-1 acts as a modulator of mechanotransduction activity and presynaptic ribbon assembly. *J Cell Biol* 207, 375-91
- Palmer, A.R., and Russell, I.J. (1986) Phase-locking in the cochlear nerve of the guinea-pig and its relation to the receptor potential of inner hair-cells. *Hearing Research* 24,1-15.
- Pennings, R.J., Damen, G.W., Snik, A.F., Hoefsloot, L., Cremers, C.W., and Mylanus, E.A. (2006). Audiologic performance and benefit of cochlear implantation in Usher syndrome type I. *Laryngoscope* 116, 717-722.
- Pepermans, E., Michel, V., Goodyear, R., Bonnet, C., Abdi, S., Dupont, T., Gherbi, S., Holder, M., Makrelouf, M., Hardelin, J.P., *et al.* (2014). The CD2 isoform of protocadherin-15 is an essential component of the tip-link complex in mature auditory hair cells. *EMBO Mol Med* 6, 984-992.
- Pujol, R., and Puel, J.L. (1999). Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: a review of recent findings. *Ann N Y Acad Sci* 884, 249-254.

- Roux, I., Safieddine, S., Nouvian, R., Grati, M., Simmler, M.-C., Bahloul, A., Perfettini, I., Le Gall, M., Rostaing, P., Hamard, G., *et al.* (2006). Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell* *127*, 277-289.
- Safieddine, S., El-Amraoui, A., Petit, C. (2012). The auditory hair cell ribbon synapse: from assembly to function. *Annu Rev Neurosci* *35*, 509-528.
- Sahly, I., Dufour, E., Schietroma, C., Michel, V., Bahloul, A., Perfettini, I., Pepermans, E., Estivalet, A., Carette, D., Aghaie, A., *et al.* (2012). Localization of Usher 1 proteins to the photoreceptor calyceal processes, which are absent from mice. *J Cell Biol* *199*, 381-399.
- Schneider, R., Hosity, E., Kohl, J., Klueva, J., Choquet, D., Thomas, U., Voigt, A., and Heine, M. (2015) Mobility of calcium channels in the presynaptic membrane. *Neuron* *86*, 672-9.
- Stölting, G., de Oliveira, R.C., Guzman, R.E., Miranda-Laferte, E., Conrad, R., Jordan, N., Schmidt, S., Hendriks, J., Gensch, T., and Hidalgo, P. (2015) Direct interaction of CaV $\beta$  with actin up-regulates L-type calcium currents in HL-1 cardiomyocytes. *J Biol Chem* *290*, 4561-72.
- Torregrosa-Hetland, C.J., Villanueva, J., Lopez-Font, I., Garcia-Martinez, V., Gil, A., Gonzalez-Velez, V., Segura, J., Viniestra, S., and Gutierrez, L.M. (2010). Association of SNAREs and calcium channels with the borders of cytoskeletal cages organizes the secretory machinery in chromaffin cells. *Cell Mol Neurobiol* *30*, 1315-1319.
- Vastinsalo, H., Jalkanen, R., Dinculescu, A., Isosomppi, J., Geller, S., Flannery, J.G., Hauswirth, W.W., and Sankila, E.M. (2011). Alternative splice variants of the USH3A gene Clarin 1 (CLRN1). *Eur J Hum Genet* *19*, 30-35.
- Vincent, P.F., Bouleau, Y., Safieddine, S., Petit, C., and Dulon, D. (2014). Exocytotic machineries of vestibular type I and cochlear ribbon synapses display similar intrinsic otoferlin-dependent Ca<sup>2+</sup> sensitivity but a different coupling to Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurosci* *34*, 10853-10869.
- Vincent, P.F., Bouleau, Y., Petit, C., and Dulon, D. (2015). A synaptic F-actin network controls otoferlin-dependent exocytosis in auditory inner hair cells. *Elife* (*revision*).
- Yamada, S., and Nelson, W.J. (2007). Synapses: sites of cell recognition, adhesion, and functional specification. *Annu Rev Biochem* *76*, 267-294.
- Zallocchi, M., Meehan, D.T., Delimont, D., Rutledge, J., Gratton, M.A., Flannery, J., and Cosgrove, D. (2012). Role for a novel Usher protein complex in hair cell synaptic maturation. *PLoS One* *7*, e30573.

**Figure 1: Different hearing impairments in *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice and *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice**  
**(A)** Topological representation of the murine clarin-1, a four transmembrane domain containing protein displaying a type-II PDZ-binding motif (PBM, boxed) at its C-terminal region. **(B)** ABR threshold responses. In *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice (light to dark red curves,  $n = 28$ ), ABR thresholds (mean  $\pm$  SEM) show a progressive increase as compared to control mice (grey and black curves,  $n = 16$ ). *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice display profound congenital deafness (blue curve,  $n = 7$ ). In *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice, ABR thresholds at 10 and 15 kHz continue to increase after P20, from their 20 dB SPL normal value up to 40 dB SPL at P15-P20, 65 dB SPL at P21-P28, and 80 dB SPL at P31-P54. **(C)** DPOAE threshold responses. DPOAEs are absent in *Clrn1*<sup>-/-</sup> (blue triangles) mice as early as P15. By contrast, *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice display unaffected DPOAE thresholds up to P20. From P20 onwards, DPOAE thresholds slowly increase by about 20-30 dB SPL. **(D)** Compound action potential (CAP) responses. Bar charts represent CAP wave I amplitude and latency, which are significantly reduced and delayed, respectively, in *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice. (\*)  $p < 0.05$  (Student's  $t$  test).

**Figure 2: Abnormal hair bundle structure in *Clrn1*<sup>-/-</sup>, but not *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice**  
**(A-F)** The OHC hair bundles of *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice display linear, wavy, and/or hooked shapes **(B, E)**, unlike the V-shaped hair bundles in control **(A, D)** and *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> **(C, F)** mice. The stereocilia of the short row (colored in red) have entirely regressed in most OHCs of P12 *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice **(E)**, but not in P20 *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice **(F)**. **(G)** F-actin labeling of the cuticular plate in *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice is irregular, with the presence of furrows delimiting the regions of clumped stereocilia. **(H)** The distribution of USH1 proteins (green) —harmonin b, and protocadherin-15 at the tip of F-actin labeled stereocilia (red) was unaffected in *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice, even in the stereocilia of the fragmented hair bundles. The SEM micrographs show representative OHC hair bundles with abnormal shapes, similar to the immuno-stained hair bundles in **(G, H)**. Scale bars = 1  $\mu$ m.

**Figure 3: Abnormal Ca<sup>2+</sup> currents in mutant IHCs lacking clarin-1**  
**(A-D)** Ca<sup>2+</sup> currents in IHCs were activated with a depolarizing voltage-ramp protocol (1 mV/ms) from -90 to +30 mV. The amplitude of Ca<sup>2+</sup>-currents is normal on P9, but is larger in *Clrn1*<sup>-/-</sup> (blue curves, A, B) and *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> (red curves, C, D) mice than in controls (black curves, A-D) on P13. **(E)** Comparative change in the peak Ca<sup>2+</sup> current density (peak  $I_{Ca^{2+}}$  at -10 mV normalized with respect to cell size) with age, at pre- and post-hearing stages (from P6 to P18), in IHCs of *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-Cre*<sup>+/-</sup> and control mice. **(F)** Boltzmann fit of the I-V curve for IHC Ca<sup>2+</sup>-currents (100 ms-voltage steps) in P18 control and *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-Cre*<sup>+/-</sup> mice. **(G)** Comparative change in the half voltage-activation of  $I_{Ca^{2+}}$  ( $V_{1/2}$ ) before and after the onset of hearing (from P6 to P18) in IHCs from *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-Cre*<sup>+/-</sup> and control mice. **(H, I)** Activation time constant of  $I_{Ca^{2+}}$  measured for various voltage steps from a holding potential at -80 mV in IHCs of P13 *Clrn1*<sup>-/-</sup> **(H)**, P18 *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-Cre*<sup>+/-</sup> **(I)** mice, and of the corresponding control mice. **(J)** IHCs from *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-Cre*<sup>+/-</sup> (red) and control (black) P18 mice were voltage-stepped from -80 mV to various membrane potentials for 100 ms (inset: current traces from a *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-Cre*<sup>+/-</sup> mouse and a control mouse). The amount of current reduction at the end of the 100 ms step (CDI) was expressed as a percentage (%):  $CDI = [I_{Ca^{2+}}^{peak} - I_{Ca^{2+}}^{100\text{ ms}}] / I_{Ca^{2+}}^{peak}$ . Values are means  $\pm$  SEM. (\*)  $p < 0.05$  (unpaired t-test). (n) number of cells.

**Figure 4: Lower efficiency of Ca<sup>2+</sup>-mediated exocytosis in mutant IHCs lacking clarin-1**  
**(A-D)** Exocytosis was measured after various voltage steps between -80 mV and -5 mV, with each voltage-step lasting 100 ms **(A-C)** or 25 ms **(D)**. Data were fitted with a simple power

function ( $y = ax^N$ , with  $a$  indicating the exocytotic slope efficiency and  $N$  the power index, table S1.2). The efficiency of  $Ca^{2+}$  on IHC exocytosis, normal at P9, is significantly decreased in P13 *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice ( $a = 0.13 \pm 0.01$  fF/pA ( $n = 6$ ) in control littermates, and  $a = 0.04 \pm 0.01$  fF/pA ( $n = 9$ ) in mutant mice;  $p < 0.05$ ) and in P13 *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice ( $a = 0.16 \pm 0.01$  fF/pA ( $n=15$ ) in control littermates, and  $a = 0.07 \pm 0.01$  fF/pA ( $n = 11$ ) in mutant mice,  $p < 0.05$ ). The cooperative index values were not significantly different between mutants and controls (see Table S1.2). (E) Kinetics of exocytosis measured for constant voltage-steps from -80 to -10 mV, with durations increasing from 10 to 100 ms, in IHCs of P18 *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> (red) and control (black) mice. Intracellular  $Ca^{2+}$  buffer was 1 mM or 5 mM EGTA. Data were fitted with a simple exponential function, with similar time constants of  $25 \pm 10$  ms ( $n=12$ ) and  $33 \pm 18$  ms ( $n = 11$ ) for controls in 1 and 5 mM EGTA, respectively. For *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> IHCs, the time constant increased from  $102 \pm 50$  ms ( $n = 27$ ) in 1 mM EGTA to  $205 \pm 32$  ms ( $n = 10$ ) in 5 mM EGTA ( $p < 0.05$ ). Exocytosis in mutant IHCs lacking clarin-1 was highly sensitive to the intracellular EGTA concentration, suggesting a loose coupling between  $Ca^{2+}$  channels and the sites of neurotransmitter release. (F-H) Mean exocytotic response curves evoked by UV-uncaging of intracellular  $Ca^{2+}$  in IHCs of P14 *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> (red) and control (black) mice. (G) Exocytosis rates after UV-illumination, obtained by a derivative function (dC/dt) of the curves shown in (F). (H) Comparative exocytotic peak upon  $Ca^{2+}$  photorelease in mutant and control IHCs. Values are means  $\pm$  SEM. (\*)  $p < 0.05$  (unpaired t-test).

### Figure 5: Molecular and structural changes at the IHC ribbon synapse in the absence of clarin-1

(A) Two representative IHCs of P20 *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice stained for otoferlin (green) and ribeye (red), showing the proper location of the ribbons in the basolateral region of IHCs despite the absence of clarin-1. The bar chart shows the number (mean  $\pm$  SEM) of synaptic ribbons per IHC, which is similar in P20 *Clrn1*<sup>-/-</sup> (blue), *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> (red), and control (black) mice. (B) Representative electron micrographs of IHC synaptic ribbons from P15 *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice. Round-, droplet- and oval-shaped ribbons coexist in mutant IHCs lacking clarin-1. (C) Quantitative analysis shows that IHCs of *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice display normal occurrence of round-shaped (immature) and droplet-shaped (mature) ribbons. By contrast, in IHCs of *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice, round-shaped ribbons were numerous on P15, but much less on P28. (D) The number of  $Ca_v1.3$ -immunoreactive patches, which are associated with ribbons, per IHC is similar in control (black) and *Clrn1*<sup>-/-</sup> (blue) mice on both P9 and P13. The numbers of  $Ca_v1.3$  patches counted are indicated in brackets. (E) Representative confocal images of  $Ca_v1.3$  (green)- and ribeye (red)-immunoreactive patches, and a line scan analysis (intensity profile for a single  $Ca_v1.3$ -ribeye associated patch) in P15 control, P15 *Clrn1*<sup>-/-</sup>, and P18 *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice. (F, G) Quantitative analysis of  $Ca_v1.3$  and ribeye-immunoreactive patches in P9 and P13 control (black) and *Clrn1*<sup>-/-</sup> (blue) mice. (F) Each  $Ca_v1.3$  (green)- and ribeye (red)- coimmunoreactive patch was analyzed to determine the rate of colocalization between  $Ca_v1.3$ - and ribeye-immunoreactive areas. The rate of colocalization, defined as the fraction of the  $Ca_v1.3$  immunoreactive area also labeled for ribeye, normal on P9, is much reduced on P13. (G) Representative Imaris 3D images and quantitative analysis (bar chart) of immunoreactive patches in the synaptic basal region of IHCs from P13 control and *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice.  $Ca_v1.3$  channels form larger patches in the active zone, and the ribbons are smaller in IHCs lacking clarin-1 than in control IHCs. (H) The F-actin cortical network labeled with fluorescent phalloidin (purple) is altered in the IHC synaptic region of *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice on P9 and P13. The blue labeling, when present, indicates otoferlin immunoreactivity. Bar chart shows mean values  $\pm$  SEM. (ns), (\*), and (\*\*\*) denote



not significant,  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  (unpaired t-test), respectively. Scale bars = 5  $\mu\text{m}$  (A) 100 nm (B), 1  $\mu\text{m}$  (E, F, H).

### Figure 6: Interactions between clarin-1, harmonin, and the Ca<sub>v</sub>1.3 channel complex

(A) GST-tagged clarin-1 N-terminal region (Clrn1-N), and C-terminal region (Clrn1-C) bind to GFP-tagged Ca<sub>v</sub>β2 produced in HEK293 cells, whereas GST alone does not. No binding is observed with GFP-tagged Rab11 or EGFP alone. (B) In a coimmunoprecipitation assay, anti-flag M2 resin was incubated with HEK293 cells coproducing Flag-tagged BAID, mCherry clarin-1, and GFP-tagged Ca<sub>v</sub>β2, or mCherry clarin-1 and GFP-tagged Ca<sub>v</sub>β2. Significant binding between BAID and clarin-1 is observed in the presence of Ca<sub>v</sub>β2. (C) GST-tagged Clrn1-C, but not GST alone, binds to myc-tagged harmonin b. (D) GST-tagged harmonin a, but not GST alone, binds to GFP-tagged Ca<sub>v</sub>β2. The diagrams in A, C and D show the domain structure of clarin-1 fragments and harmonin used in the binding experiments. (E) The binding of GST-tagged Clrn1-N to GFP-tagged Ca<sub>v</sub>β2 increases with the presence of increasing amounts of myc-tagged harmonin b. (F) Schematic representation of a synaptic active zone summarizing the interactions between clarin-1, the Ca<sup>2+</sup> channel subunits Ca<sub>v</sub>β2, and Ca<sub>v</sub>α<sub>1</sub>, and harmonin.

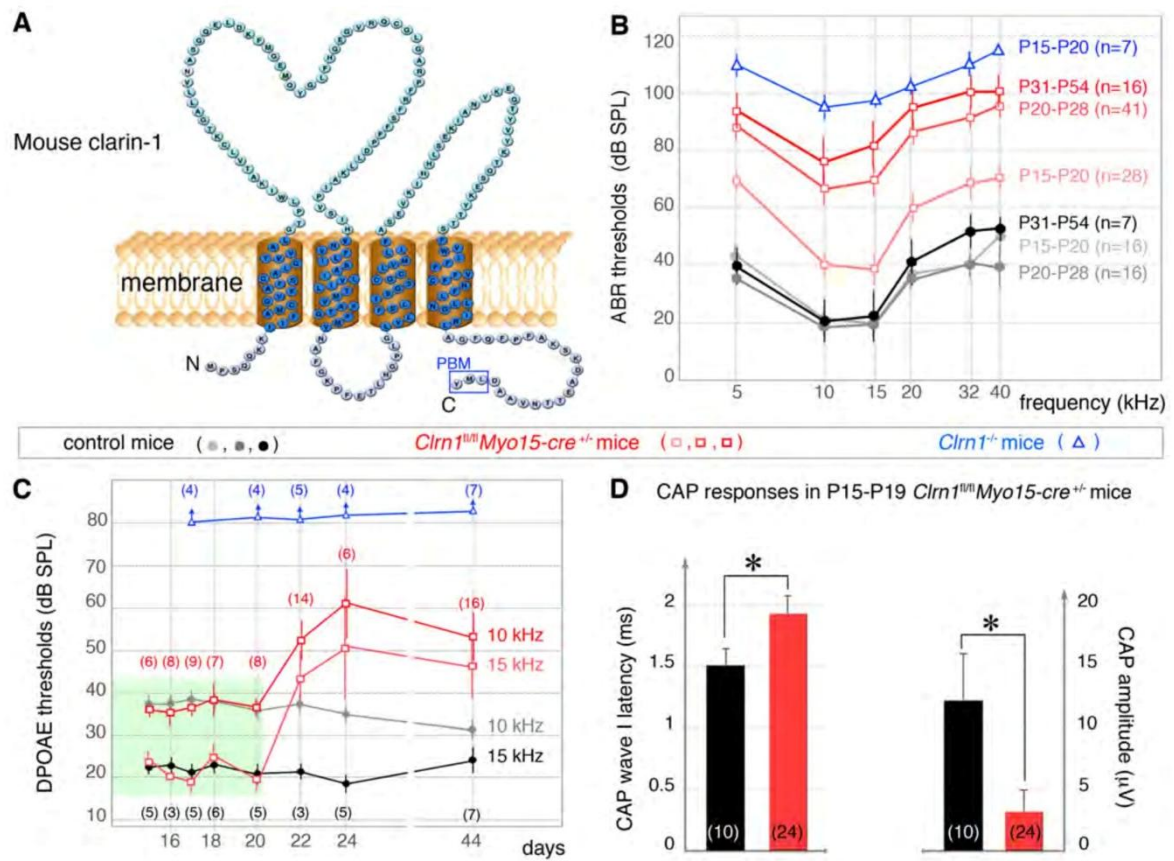
### Figure 7: IHC post-synaptic defects in clarin-1-deficient mice

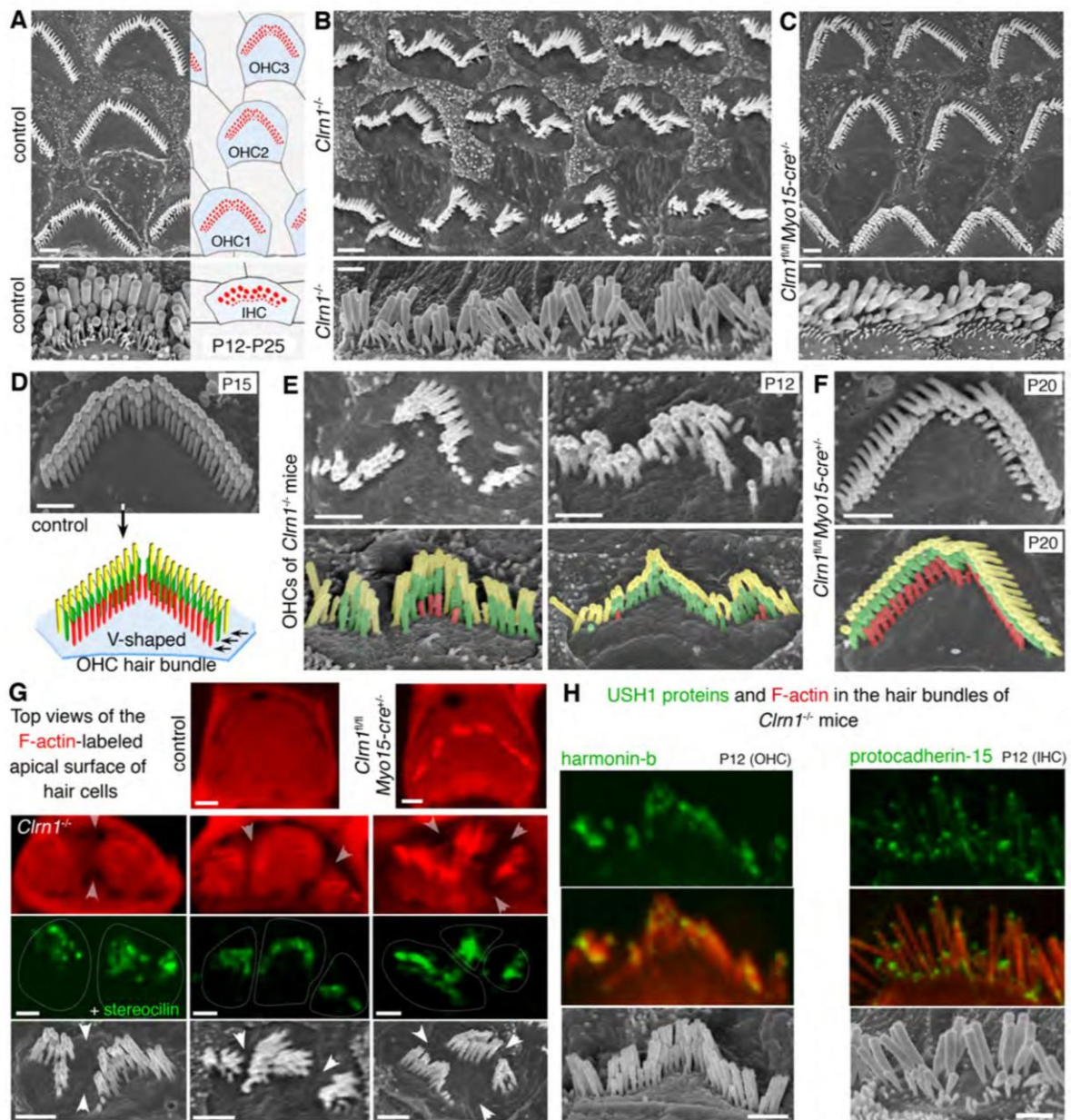
(A) Representative electrically evoked brainstem responses (EEBRs) in cochleas of P20 control, *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>*, and *Clrn1<sup>-/-</sup>* mice. The first large downward inflexion is due to the electrical artefact. Note that in these conditions of stimulation, wave I is not visible as the IHC synaptic processes are bypassed. The EEBR wave II (EII) and later waves (EIII and EIV), corresponding to the responses of higher auditory centers, are clearly visible in the control mouse (black trace), absent in *Clrn1<sup>-/-</sup>* mice (blue trace), and significantly delayed and reduced in *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice (red trace). (B, C) Representative micrographs of the IHC synaptic region (B) and the cochlear ganglion (C) illustrating the expansion of postsynaptic terminals in *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice, and the loss of primary auditory neurons in *Clrn1<sup>-/-</sup>* mice. (D) IHCs of control and *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice. The postsynaptic GluA2/3-immunoreactive domain (green) is abnormally expanded in the afferent nerve terminals underneath IHCs of *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice. (E) Neurofilament (NF)-200 (green)-immunostained cochleas showing a pronounced loss of nerve fibers in *Clrn1<sup>-/-</sup>* mice (arrows), relative to control and *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice of the same age. Scale bars = 500 nm (B), 20  $\mu\text{m}$  (C, E), 5  $\mu\text{m}$  (D).

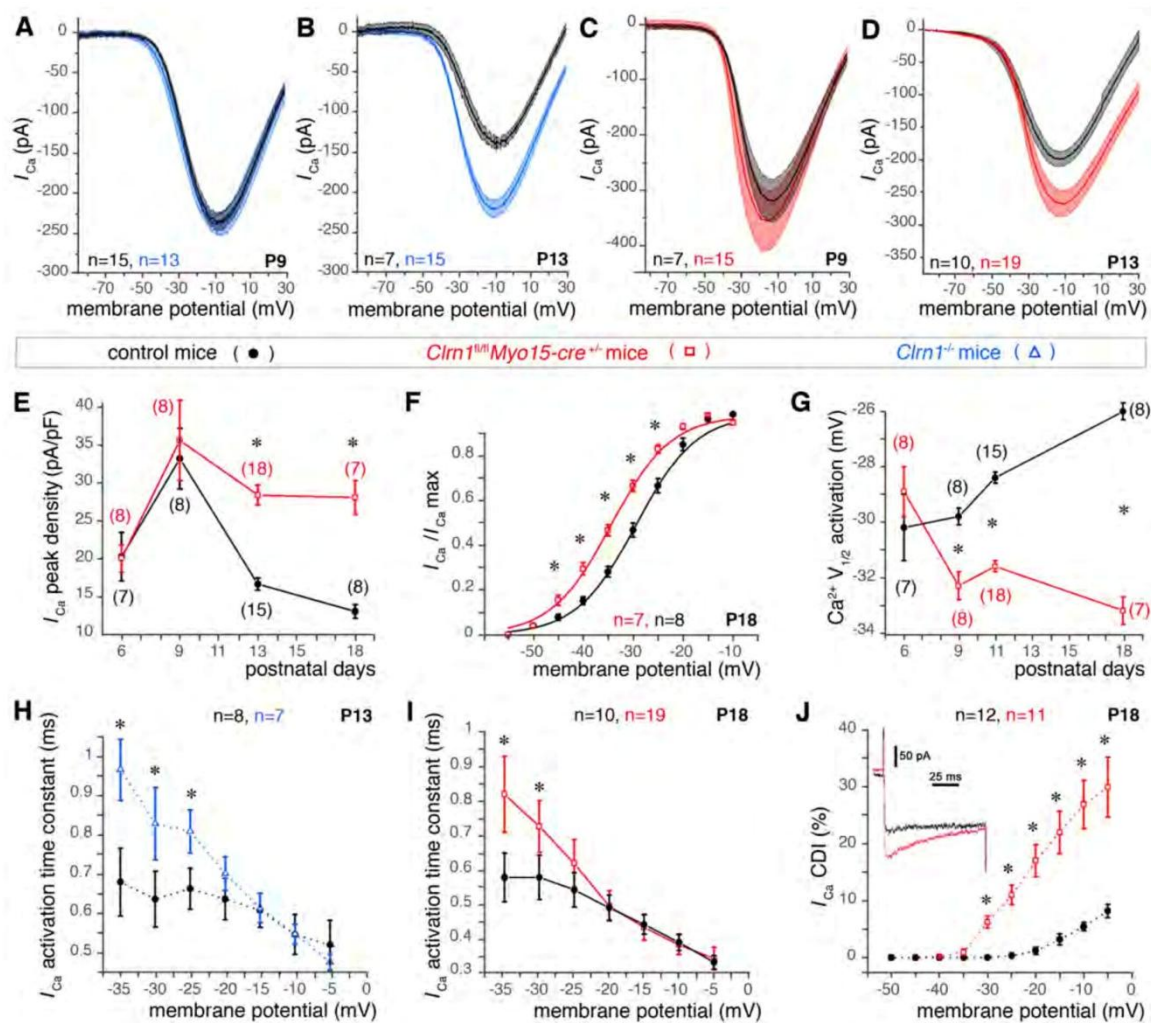
### Figure 8: AAV2/8-mediated delivery of clarin-1 into hair cells partially restores hearing function

(A) Upper panel: schematic representation of the AAV2/8-*Clrn1*-IRES-*GFP* used for gene delivery to the cochlea on P2-P3. Lower panels: In the injected ear of a *Clrn1<sup>-/-</sup>* mouse, about 90% of IHCs, and 20% of OHCs were GFP-labeled on P14-P20, indicating the re-expression of clarin-1 in these cells. (B) ABR thresholds (mean  $\pm$  SD) in injected (straight line) and not-injected (dashed line) inner ears of P20-P27 *Clrn1<sup>-/-</sup>* (triangles,  $n = 7$ ), *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* (squares,  $n = 20$ ) and control (circles,  $n = 16$ ) mice. About 10 dB decrease in ABR thresholds only was observed in *Clrn1<sup>-/-</sup>* injected ears, whereas in *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* injected ears, clarin-1 supplementation prevented the hearing impairment, as compared to non-injected ears. (ns), (\*\*), and (\*\*\*) denote not significant,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  (unpaired t-test), respectively. (C) Early postnatal AAV2/8-mediated delivery of clarin-1 into *Clrn1<sup>-/-</sup>* ears did not prevent or correct the misshaping of the hair bundles. (D, E) Conversely, at the IHC synapse (P15-P18), re-expression of clarin-1 in *Clrn1<sup>-/-</sup>* IHCs led to normal levels of Ca<sup>2+</sup>-currents, and normal efficiency and kinetics of exocytosis (D; table S2.1;  $p > 0.05$ ), and

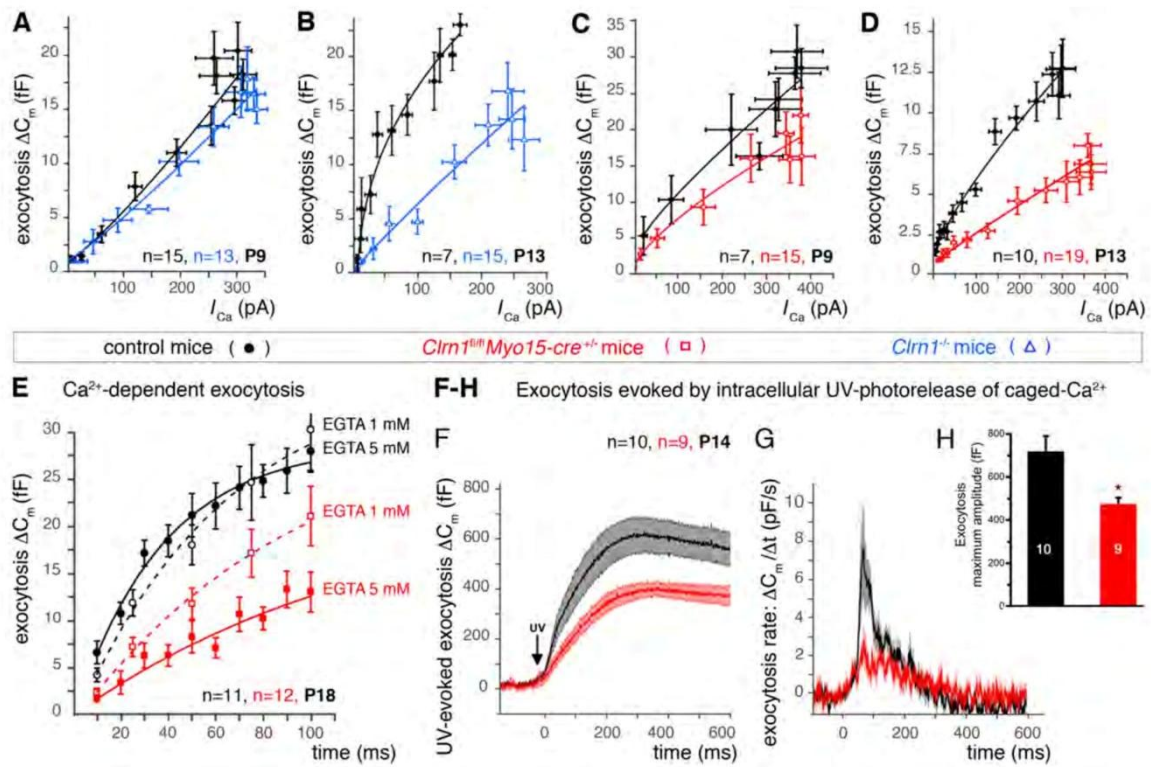
restored the tight clustering of  $\text{Ca}^{2+}$  channels at the IHC active zone, as shown by the line scan intensity profiles of  $\text{Ca}_v1.3$ - and ribeye-immunoreactive patches through two ribbons (**E**). The ratio of the coimmunoreactive area (overlap between  $\text{Ca}_v1.3$  and ribeye) to the  $\text{Ca}_v1.3$  immunoreactive domain did not differ between control IHCs ( $64 \pm 3\%$ ,  $n = 60$  ribbons) and IHCs from *Cln1*<sup>-/-</sup> mice injected with AAV2/8-*Cln1* ( $57 \pm 3\%$ ;  $n = 54$  ribbons,  $p = 0.22$ ), on the contrary to IHCs from untreated *Cln1*<sup>-/-</sup> mice ( $38 \pm 3\%$ ;  $n = 89$  ribbons,  $p < 0.05$ ). Scale bars = 5  $\mu\text{m}$  (**A**, **C**), 1  $\mu\text{m}$  (**E**)

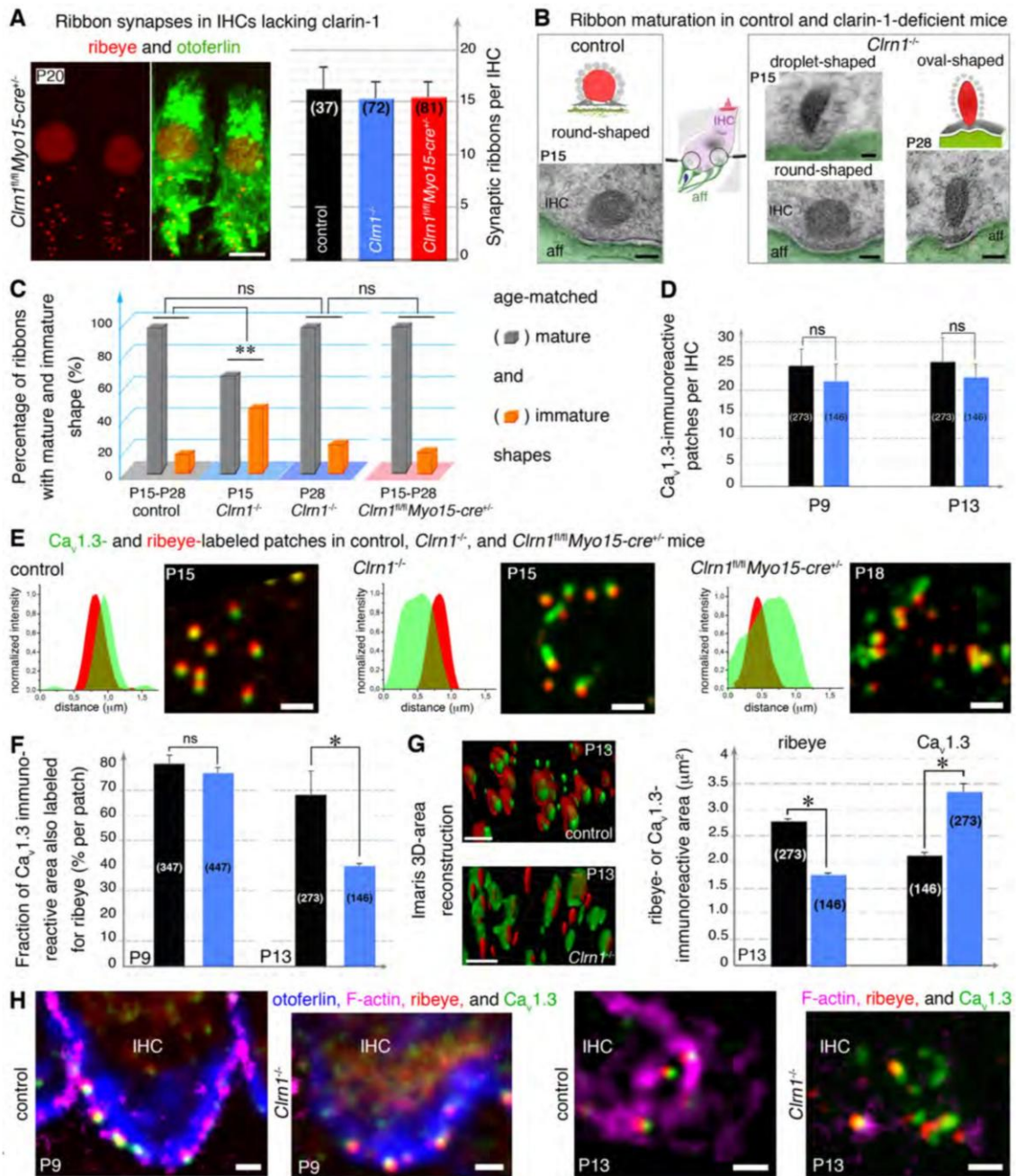


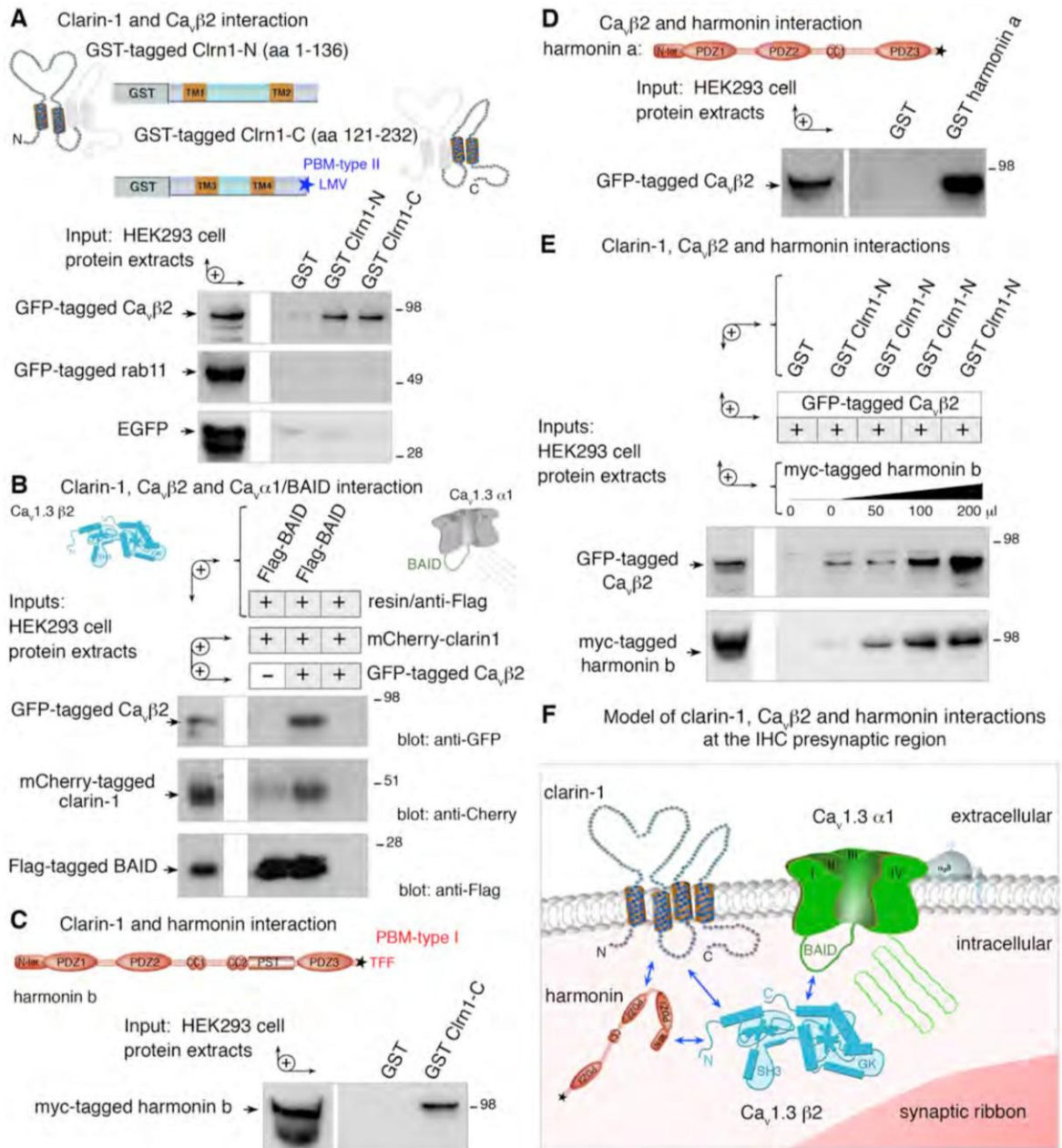




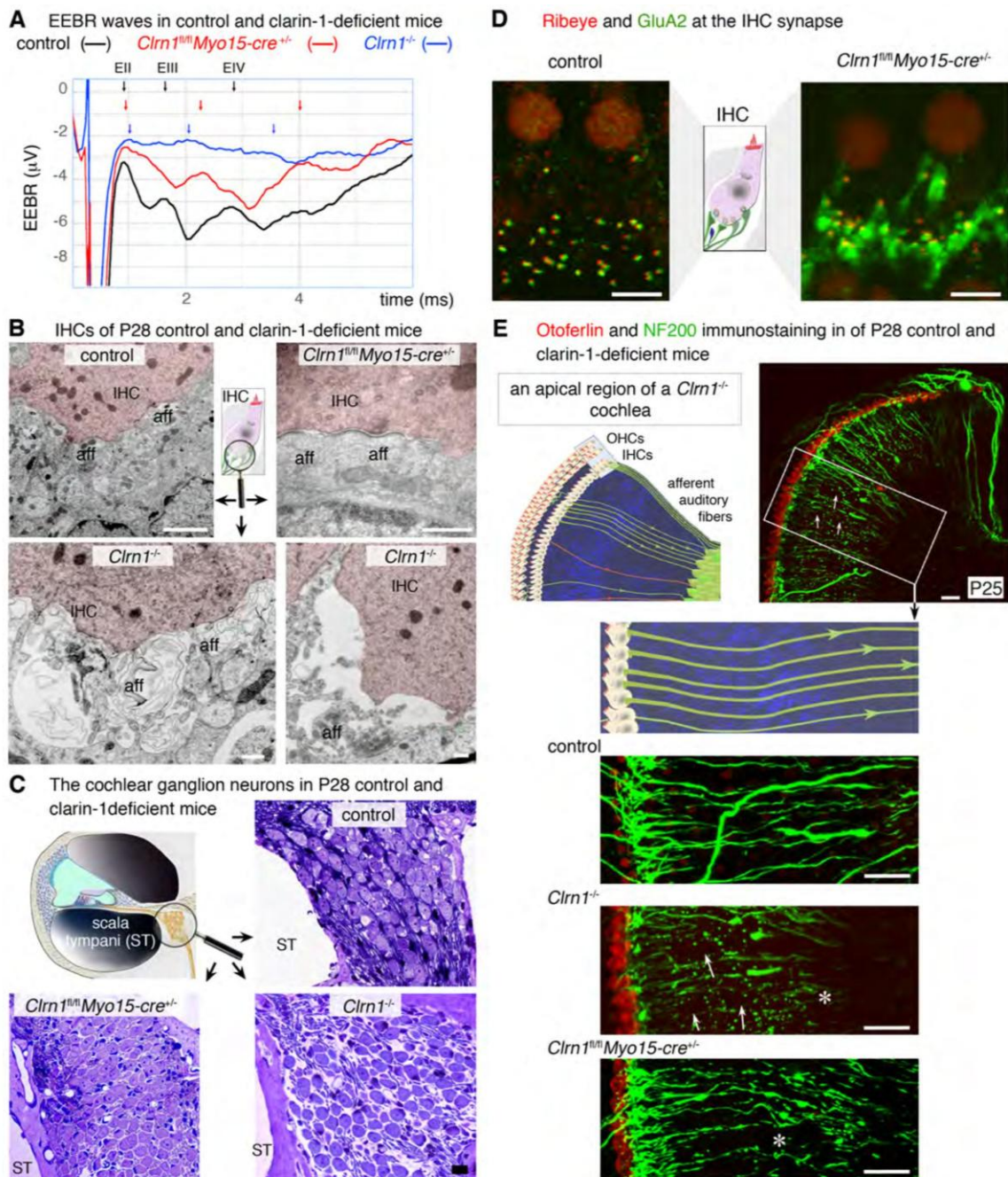


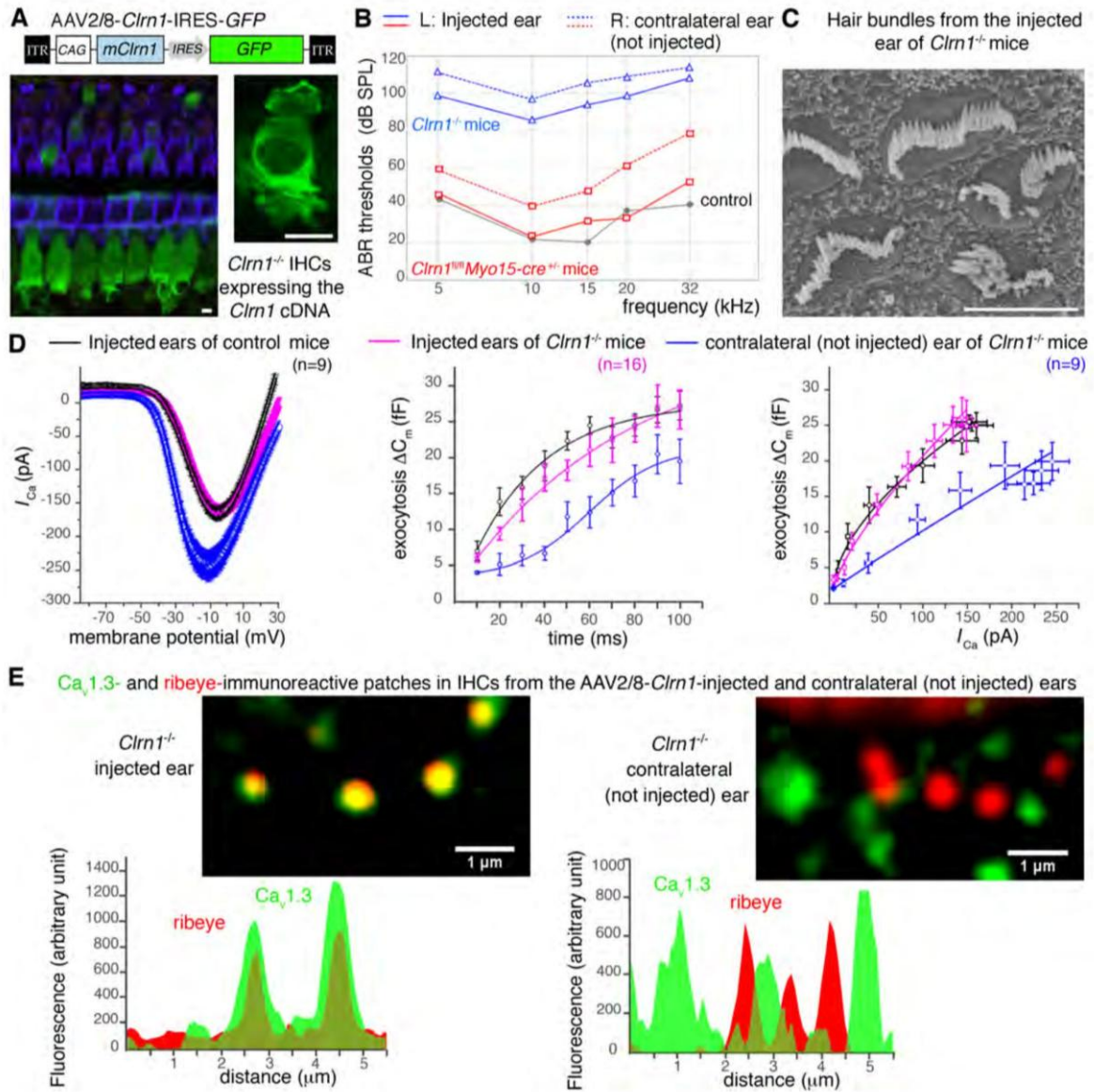












### Generation of clarin-1-deficient mice

To engineer clarin-1-deficient mice, we added LoxP sites on both sides of *Clrn1* exon 4 (see Fig. S1B, C). The *Clrn1*<sup>fl/fl</sup> mice, after deletion of the *neo* cassette, were crossed with *PGK-cre*<sup>+/-</sup> mice to obtain a precocious and ubiquitous absence of clarin-1 (*Clrn1*<sup>-/-</sup> mice), and with *Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice {Caberlotto, 2011 #14;Pepermans, 2014 #178} to eliminate clarin-1 specifically from hair cells at postnatal stages (*Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice). The absence of the cre-recombinase in the cochlear ganglion neurons of the latter mice was confirmed by using *ROSA26*<sup>+/-</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice analyzed for the expression of *lacZ*.

### Expression vectors, antibodies and reagents

The mouse cDNA encoding full-length clarin-1 (NP\_700434.1), obtained from a mouse inner ear cDNA library, was used to produce clarin-1 fragments. We engineered two clarin-1 fragments, Clrn1-N (amino acids (aa) 1-136) and Clrn1-C (aa 121-232). All PCR-amplified fragments were inserted into pCR2.1-TOPO (Invitrogen), and their sequences were checked before transfer to the appropriate vectors, *i.e.* mCherry, pEGFP, pEGFP and pEYFP (Clontech), pCMV-tag3B (Myc tag, Stratagene), and pcDNA3 (No tag or V5/His tag, Invitrogen) for *in vitro* translation and transfection experiments, and pXa3 (Biotin tag, Promega) or pGEX-//2 (GST tag, Amersham) for protein production. The cDNAs encoding the rat Ca<sub>v</sub>1.3  $\alpha_1$  (aa 1-2203, NP\_058994.1) and  $\beta_2$  (aa 2-604, NP\_4466303.1) subunits (kindly provided by S. Seino, Kobe University Graduate School of Medicine, Japan), and the BAID domain of Ca<sub>v</sub> $\alpha_1$  (aa 406-576, NP\_058994.1) were also used for *in vitro* binding experiments.

The specificity of the anti-clarin-1 purified antibodies, directed against the Clrn1-N peptide was checked by immunocytofluorescence and immunoblot analyses. For the detection of USH proteins, anti-myosin VIIa {El-Amraoui, 1996 #20}, anti-cadherin-23 {Bahloul, 2010 #98}, anti-sans {Caberlotto, 2011 #14}, anti-harmonin, anti-protocadherin-15, anti-usherin, anti-ADGRV1, and anti-whirlin {Sahly, 2012 #175} antibodies were used. The following primary antibodies were also used: mouse and rabbit anti-CtBP2 antibodies (BD Biosciences) to visualize the ribbon protein ribeye, rabbit anti-Ca<sub>v</sub>1.3 (Alomone Labs), rabbit anti-GluA2/3 (1:200; Millipore), mouse anti-otoferlin {Roux, 2006 #119}, rabbit anti-GFP (Invitrogen), mouse anti-myc (sc-40, Santa Cruz), mouse anti-Flag2 tag (F3165, Sigma Aldrich), and chicken anti-neurofilament (NF200, Millipore) antibodies. The secondary antibodies (Invitrogen) were: Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit, Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse, Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-goat, Cy3-conjugated anti-mouse and Cy3-conjugated anti-rabbit and Alexa 488-conjugated goat anti-chicken antibodies.

### Immunofluorescence and electron microscopy analyses

All the experiments on animals were carried out according to the protocols approved by the Animal Use Committees of INSERM and Institut Pasteur (CETEA-2012-0038). Inner ears were fixed by incubation in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, at 4°C for 1-2 hours, except for the detection of Ca<sub>v</sub>1.3, for which cochleas were perfused and fixed with 100 % cold methanol at -20°C for 30 min.

For immunofluorescence analyses, samples (dissected organs of Corti) were incubated in PBS supplemented with 30% normal horse serum for 1 hour at room temperature. They were then washed three times in PBS, and incubated at 4°C overnight with the primary antibodies, diluted in PBS supplemented with 5% horse serum and 0.1% Triton X-100. The samples were rinsed in PBS, labeled for 1-2 hours with the appropriate secondary antibodies, and counterstained with DAPI nuclear stain (Sigma) and/or phalloidin conjugated with either TRITC (Sigma) or Alexa546 (Invitrogen) to visualize actin filaments. Images were acquired with Leica SP8 (Leica, Bordeaux Imaging Center) or Zeiss LSM700 (Zeiss, Pasteur Institute)

confocal laser scanning microscopes (LSMs) equipped with a plan Apo 63x NA 1.4 oil immersion objective lens, and they were processed with Photoshop CS6 as previously described {Sahly, 2012 #175}. Ribbon synapses and/or  $Ca_v1.3$ -immunoreactive spots were counted as described {Khimich, 2005 #152; Roux, 2006 #119}, using 3D reconstructions of all confocal z-stacks of IHC-labeled cells, and focusing on ribbons juxtaposed with the postsynaptic GluR2/3 immunoreactive spots. To obtain a count per IHC (mean  $\pm$  SEM), the number of ribbons counted was divided by the number of IHCs analyzed. All comparisons between control and clarin-1-deficient mice were processed under the same conditions of preparation, acquisition and analysis. For surface areas quantification, z-stack confocal images (0.250  $\mu$ m) were treated for deconvolution with AutoQuant X2 (blind deconvolution), and 3D construction was then varied out with Imaris software (Bitplane AG).

For ultrastructural analyses, cochleas were perfused with 4% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in PBS at pH 7.4, and immersed in the same fixative solution for 2 hours. They were then post-fixed by overnight incubation in 1% osmium tetroxide at 4°C, dehydrated in graded series of acetone concentrations, and embedded in Spurr's low-viscosity epoxy resin hardened at 70°C. Ultrathin sections were cut and transferred to formvar-coated single-slot grids, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a Jeol1200EX electron microscope (Pasteur, Imageopole) {Roux, 2006 #119; Vincent, 2014 #192}

For scanning electron microscopy, inner ears were fixed by incubation in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3) for 2 hours at room temperature. The samples were washed several times in the buffer alone, and cochlear sensory epithelia were carefully dissected and processed by the osmium tetroxide/thiocarbohydrazide (OTOTO) method, as previously described {Kamiya, 2014 #211}. Samples were analyzed by field emission scanning electron microscopy (Jeol JSM6700F operating at 5 kV). Images were obtained with a charge-coupled device camera (SIS Megaview3; Surface Imaging Systems), acquired by analySIS (Soft Imaging System), and processed with Photoshop CS6.

### Protein-protein binding experiments

For *in vitro* binding assays, equal amounts of fusion proteins were used as previously described {Papal, 2013 #174}. Fusion proteins were produced in BL21(DE3)codonPlus-RP *E. coli* cells and HEK293 cells, used as bacterial and eukaryotic expression systems, respectively. Transfections were performed at 90-95% confluence, in the presence of Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen), in accordance with the manufacturer's recommendation, as previously described {Legendre, 2008 #94}. Tagged fusion proteins were purified with the appropriate resin for the tag used: GST (glutathione Sepharose 4B, GE Healthcare), Flag, Myc, or EGFP (Milteny Biotec SAS, France). Protein extracts from the inner ears of adult mice were also used. Briefly, for clarin-1- $Ca_v\beta 2$  interaction, a bacterial lysate containing GST alone or GST-tagged Clrn1-N was incubated with pre-equilibrated glutathione-Sepharose beads at 4°C for 90 minutes. The beads were washed three times in the binding buffer (5% glycerol, 5 mM  $MgCl_2$  and 0.1% Triton X-100 in PBS) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche), and then incubated with a cell lysate of HEK293 cells producing GFP-tagged  $Ca_v\beta 2$ , on a rotating wheel at 4°C for 3 hours. The beads were then washed four times in the binding buffer supplemented with 150 mM NaCl. Bound proteins were resuspended in 30  $\mu$ l of 2x concentrated SDS sample buffer, and submitted to western blot analysis. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Jackson ImmunoResearch) and the ECL chemiluminescence system (Pierce) were used for detection.

For immunoprecipitation, HEK293 cell protein extracts or adult rat retina extracts were prepared by using 500  $\mu$ l of immunoprecipitation buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH



7.5, 500  $\mu$ M EDTA, 100  $\mu$ M EGTA, 0.1% SDS, 1% Triton-X100, and 1% sodium deoxycholate), complemented with an EDTA-free cocktail of protease inhibitors (Roche). The soluble fraction was incubated for 6 hours either with the anti-Flag, the pre-immune serum or immunoprecipitation buffer alone, then with 50  $\mu$ l of pre-equilibrated protein G beads (Pierce) at 4°C overnight. The beads were washed three times in the immunoprecipitation buffer, and the bound complexes were treated as described above.

### ***In vivo* auditory tests**

Auditory brainstem responses (ABRs), compound action potentials (CAPs), and distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) were recorded in anesthetized mice, and the results were analyzed as described {Le Calvez, 1998 #192; Kamiya, 2014 #211}. Animals were anesthetized with a mixture of ketamine (150 mg/kg) and levomepromazine (2 mg/kg), with additional half doses given every 30 min. The body temperature of the animals was maintained at 37°C with a regulated heating blanket. For CAP measurements, a Teflon-coated silver-wire electrode was surgically inserted into the round-window niche, with the negative and ground electrodes positioned subcutaneously in the skull and neck regions. The electrocochleogram was collected with a Grass preamplifier (gain x10,000) and numerically averaged (CED 1401+ processor) in synchrony with the stimulus (x32). For ABR recordings, three steel electrodes were inserted (negative and ground as for CAP measurements, with a positive electrode inserted in the mastoid region). The electroencephalogram was collected by the preamplifier with a x100,000 gain, and numerically averaged over 256 epochs.

For both ABRs and CAP, the sound stimuli used were tone-bursts produced by a Wavetek-70 arbitrary waveform generator (2-period rise and decay times, 16-period plateau) and sent to a Radioshack tweeter (40-1376, 8  $\Omega$  – 70 W) connected to a conical tip. Tone-burst frequencies were in the range of 5 to 40 kHz. At each frequency, the threshold-searching procedure could apply sound intensities from 10 to 115 dB SPL in 2 to 5 dB steps.

For DPOAE measurements,  $f_1$  and  $f_2$  stimuli were carefully applied through different earphones and tubing to avoid nonlinear interactions on earphone membranes. Only the cubic difference tone at  $2f_1-f_2$ , the most prominent one from the ear {Avan, 2013 #97}, was detected. This DPOAE comes mostly from the site of maximum overlap between basilar membrane vibrations to  $f_1$  and  $f_2$ , close to the site tuned to  $f_2$ . We therefore plotted the  $2f_1-f_2$  DPOAE against  $f_2$ . The  $f_2$  frequency was swept from 5 to 32 kHz in  $1/8^{\text{th}}$  octave steps, with  $f_1$  chosen such that the frequency ratio  $f_2/f_1$  was 1.20. The intensities of the two tonal stimuli at  $f_1$  and  $f_2$  were the same, from 20 to 80 dB SPL in 5 dB steps.

The DPOAE threshold was defined as the weakest stimulus producing a DPOAE significantly above the background noise, estimated from the spectral lines closest to  $2f_1-f_2$  in the 0.5 s sound samples collected in the ear canal. ABR and CAP thresholds were defined as the sound level producing the smallest detectable wave, shown to be reproducible to sound levels within 2 dB.

### **Hair cell electrophysiology, intracellular $\text{Ca}^{2+}$ uncaging**

For IHC electrophysiological recordings, mouse organs of Corti, at different stages of postnatal development, were bathed in an extracellular solution, with the following composition: 135 mM NaCl, 5.8 mM KCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.9 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.7 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5.6 mM glucose, 2 mM Na-pyruvate, 10 mM HEPES, 250 nM apamin, 0.5  $\mu$ M XE-991, pH 7.4. The  $\text{Ca}^{2+}$  currents were recorded in the whole-cell voltage-clamp configuration, using 3-5 M $\Omega$  resistance pipettes with an EPC 10 amplifier and Patchmaster software (Heka Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Germany). The intracellular recording solution had the following composition: 145 mM CsCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM HEPES, 1 mM EGTA, 20 mM TEA, 2 mM ATP and 0.3 mM GTP, pH 7.4. Only recordings with a holding current of less than 50 pA at -

80 mV were retained for analysis. Real-time changes in membrane capacitance ( $\Delta C_m$ ) were recorded with the software locking amplifier of Patchmaster. A 2 kHz sine wave of 10 mV was applied to the cells from a holding potential of -80 mV. Capacitance ( $C_m$ ) signals were low-pass filtered at 80 to 100 Hz. Changes in membrane capacitance were measured 0.05-0.5 s after the end of the depolarizing pulse, and averaged over a period of 0.3-20 s. Membrane and series resistance ( $R_m$  and  $R_s$ ) values were monitored during the course of the experiment. Only recordings with stable  $R_m$  and  $R_s$  were considered for further analysis.  $R_s$  ranged from 5-20 M $\Omega$ . The seal resistance was typically 5-20 G $\Omega$ .

For the intracellular photorelease of caged  $Ca^{2+}$ , hair cells were loaded with DM-nitrophen under the whole-cell patch-clamp configuration. The patch pipette solution contained: 145 mM CsCl; 5 mM HEPES; 20 mM TEA; 10 mM DM-nitrophen; and 10 mM  $CaCl_2$ . After 2-3 minutes of equilibration with the internal pipette solution, the intracellular DM-nitrophen was photolysed with a high-power collimated UV light source attached to the epifluorescence pathway of a Nikon FN-1 microscope (Prizmatix, Mic-Led-365 with a peak wavelength of  $365 \pm 4$  nm and a power of 128 mW). The  $Ca^{2+}$  indicator Fluo-5n ( $K_d = 90$   $\mu$ M) was used to calibrate the  $Ca^{2+}$  signals, and the change in fluorescence was monitored with a Nikon C2 confocal system. After exposure to a flash of UV light, the estimated intracellular concentration of free  $Ca^{2+}$  was 83  $\mu$ M.

### Statistical analysis

For *in vivo* recordings, the data were expressed as mean  $\pm$  SEM (SD: check with Paul), and statistical significance of the observed difference between groups was assessed in Student's *t* test or by two-way analysis of variance coupled to the Bonferroni post-hoc test (two-way ANOVA) or two-tailed unpaired *t* test with Welch's correction in Prism software (GraphPad, La Jolla, CA). For *ex-vivo* recordings, the data (expressed as mean  $\pm$  SEM) were analyzed with Origin (Microcal, Northampton, MA) and Igor (Wavemetrics, Portland, OR) software. One-way ANOVA tests ( $p < 0.05$ ) were performed for statistical analysis. The I/V curves were fitted with a Boltzmann function of the form " $I = I_{max} / (1 + \exp((V - V_{1/2})/S))$ ", where  $I_{max}$  is the maximum current elicited,  $V_{1/2}$  is the half-activation voltage, and S is the steepness of the plot. Statistical significances are indicated on the figures: (ns), (\*), (\*\*), and (\*\*\*) denote non significant ( $p > 0.05$ ),  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.001$ , respectively.

**Figure S1: Production of *Clrn1*<sup>-/-</sup> and *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice.** (A) The right panel illustrates the *Clrn1* construct used to generate clarin-1-deficient mice using the cre-lox system. *Clrn1* floxed mice, *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>, were engineered by adding LoxP sites on both sides of exon 4, predicted to encode the last two transmembrane domains and cytoplasmic C-terminal region of the protein. *Clrn1*<sup>fl/fl</sup> mice were crossed with *PGK-cre*<sup>+/-</sup> mice to obtain a precocious and ubiquitous absence of clarin-1 (*Clrn1*<sup>-/-</sup> mice), and with *Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice to target the removal of *Clrn1* exon 4 specifically to hair cells at postnatal stages (*Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice).

**(B) X-Gal staining in *ROSA26*<sup>+/-</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice.** To test possible expression in the cochlear ganglion, the cre-driven *lacZ* expression was studied in *ROSA26*<sup>+/-</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice using X-Gal histochemistry at postnatal day 15 (P15). *LacZ* expression is detected in the inner (IHCs) and outer (OHCs) hair cells, but not in the primary auditory neurons (cochlear ganglion neurons).

**(C) ABR threshold responses between P15 and P18 in *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice.** In *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice (light to dark red curves), ABR thresholds (mean ± SEM) show a progressive increase at P15, P16, P17 and P18. *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice display profound congenital deafness (blue curve, *n* = 7). The black curve (control mice, *n* = 16) and the blue curve (*Clrn1*<sup>-/-</sup> mice with profound congenital deafness already at P15-P20, *n* = 7) are those also shown in (Fig. 1B).

**(D) Amplitudes of distortion product otoacoustic emissions in *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice** Distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) in control (grey) and *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> (red) mice. For both 10 kHz and 15 kHz tone stimuli, DPOAE amplitudes in *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice, within the normal range at P15-P19, are significantly lower than normal at P20-P28 and P30-P60. (ns) and (\*\*\*) denote statistically not significant (*p* > 0.05), and significant (*p* < 0.0001) difference, respectively (2-way ANOVA).

**Figure S2: Abnormal shapes of the hair bundle in *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice, but not *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice**

**(A-F)** Top views of cochlear whole-mounts from *Clrn1*<sup>-/-</sup>, *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup>, and control mice (confocal and scanning electron microscopy).

**(A)** Instead of the V-shaped hair bundles in control mice (left panels), various abnormal shapes of the OHC hair bundles are observed in *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice, as shown at postnatal day 5 (P5) (right panels), including wavy, linear, and fragmented hair bundles. Representative scanning electron micrographs of OHC hair bundles displaying shapes similar to the immunostained hair bundles are presented.

**(B, C)** No hair bundle shape abnormalities are observed in OHCs from *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice. F-actin labeled with TRITC-phalloidin (red) was used to visualize the stereocilia.

**(D)** Regression of the short row stereocilia in OHCs of *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice. Examples of hair bundles from P12 control (left), *Clrn1*<sup>-/-</sup> (middle), and *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> (right) mice, illustrating the early loss of the stereocilia in the short stereocilia row (colored in red) of OHC hair bundles in *Clrn1*<sup>-/-</sup> mice. At this stage, the three rows of stereocilia are well preserved in the OHCs of *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> and control mice.

**(E)** Examples of OHC and IHC hair bundles from P30 and P54 *Clrn1*<sup>fl/fl</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> mice. While the shape of the hair bundle is preserved, many stereocilia in the short stereocilia row of both OHC and IHC hair bundles display reduced lengths, and some stereocilia have even disappeared. The stereocilia in the middle row also have variable lengths. By P54, the short row of stereocilia has disappeared in many IHC hair bundles.

**(F)** Despite variations in the lengths of stereocilia, the targeting of the tip-link component cadherin-23 (green) to the apical region of stereocilia, and the prolate (tenting) shape of

stereocilia tips (arrowheads) are preserved in the absence of clarin-1. F-actin labeled with TRITC-phalloidin (red) was used to visualize the stereocilia and cuticular plate. Scale bars=1  $\mu\text{m}$  (A, B, D-F), 5  $\mu\text{m}$  (C).

**Figure S3: Distribution of USH proteins in the hair bundle of hair cells lacking clarin-1.** (A-C) The distribution of USH1 proteins (green) — myosin VIIa, harmonin b, and cadherin-23 — in the apical region of F-actin-labeled stereocilia (red) in P12 control mice (A) is preserved in *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* (B), and *Clrn1<sup>-/-</sup>* (C) mice, irrespective of the shape of the hair bundle. Representative scanning electron micrographs of OHC hair bundles are shown in (A), (B) and (C). (D) Likewise, the specific distribution of USH2 proteins (green) — usherin and ADGRV1 — in the baso-lateral region of stereocilia (red) is not affected, even in the disrupted individual stereocilia clumps of the severely fragmented *Clrn1<sup>-/-</sup>* hair bundles shown here in isolated vestibular hair cells (VHC) and cochlear outer hair cells (OHC) on P5. Scale bars=1  $\mu\text{m}$

**Figure S4: Molecular and structural changes at the IHC synapse in the absence of clarin-1**

(A) Two otoferlin (green)- and ribeye (red)-immunostained IHCs of P20 *Clrn1<sup>-/-</sup>*, *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>*, and control mice. The location of the ribbons in the basolateral region of IHCs and their number are similar for all three genotypes.

(B) Representative electron micrographs of the IHC synaptic terminals in control (left panel) and *Clrn1<sup>-/-</sup>* (right panels) mice. In P28 control mice, all efferent terminals are in contact with the afferent terminals. By contrast, in the absence of clarin-1 (*Clrn1<sup>-/-</sup>* mice), intact and persistent efferent nerve fibers were observed to form direct contacts on IHCs, both on P15 and P28 (right panels).

(C) IHC post-synaptic defects in *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice. Whole mounts of organs of Corti of P18 control and *Clrn1<sup>-/-</sup>* mice double-immunolabeled for ribeye and GluA2 glutamate receptors. Control IHCs display restricted and juxtaposed ribeye- and GluA2-immunolabeled patches in their active zones. In contrast, a postsynaptic expansion of the GluA2-immunoreactive domains is observed in the afferent terminals facing the IHC ribbons of *Clrn1<sup>fl/fl</sup>Myo15-cre<sup>+/-</sup>* mice. Scale bars=1  $\mu\text{m}$

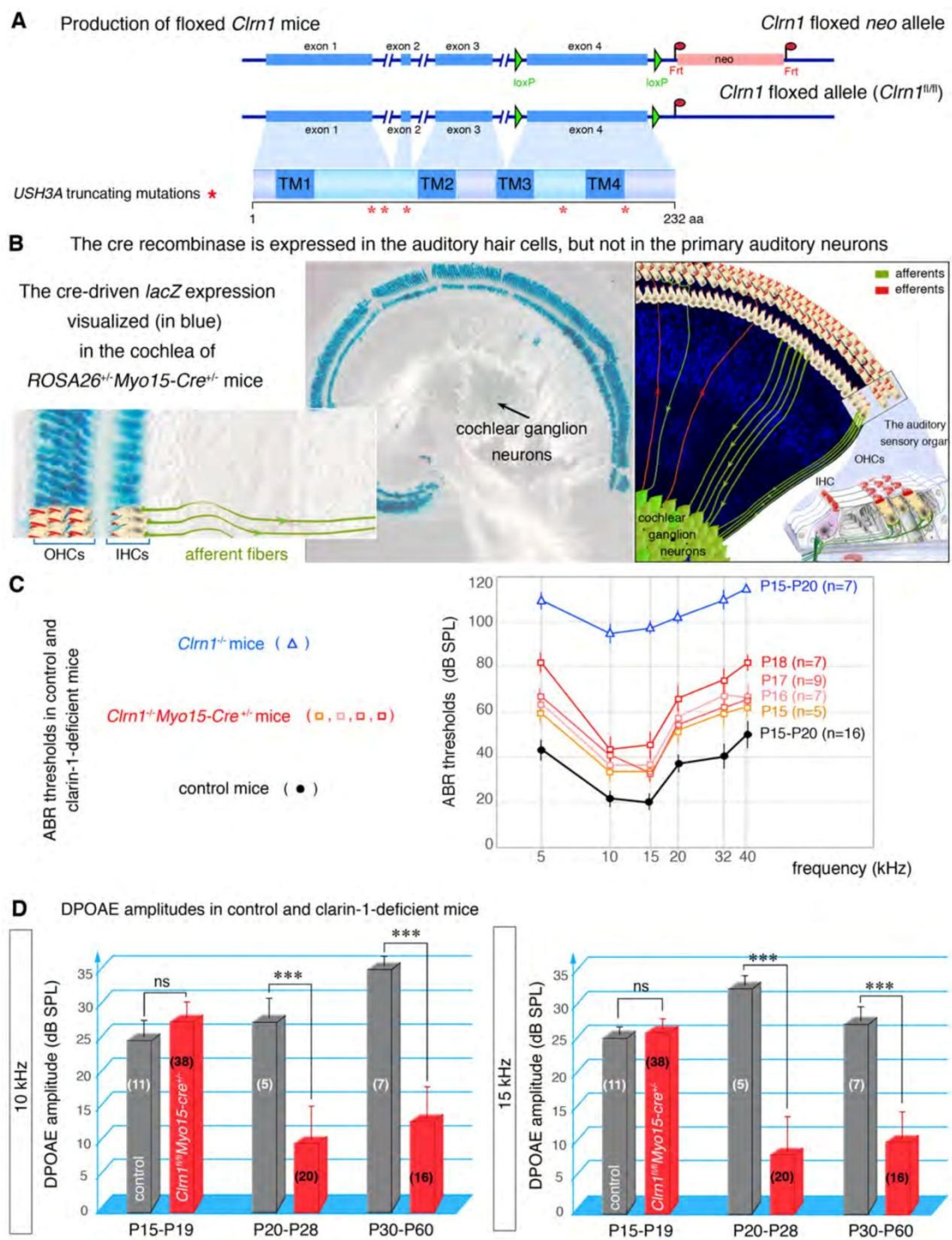
**Figure S5: Clarin-1 is required for the proper organization of the pre-synaptic  $\text{Ca}_v1.3$  channel complex and post-synaptic AMPA receptors GluA2/3.**

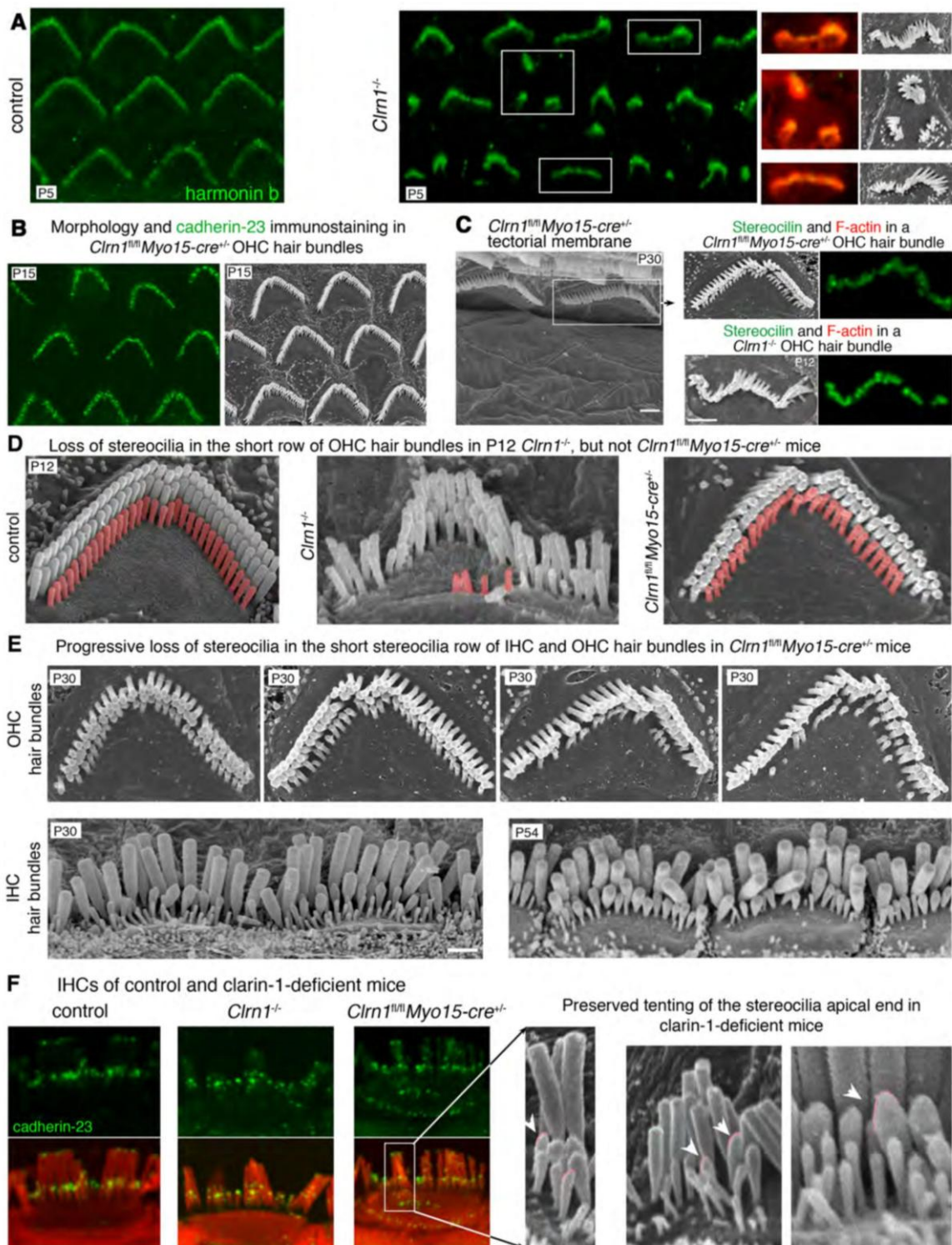
Schematic representation of a synaptic active zone in control (A, and upper panel in B), and clarin-1-deficient mice (lower panels in B).

(A) Clarin-1 in the IHC presynaptic and postsynaptic regions. At the presynapse, clarin-1 is associated with  $\text{Ca}_v1.3$   $\text{Ca}^{2+}$  channels and harmonin. It is still unknown how clarin-1 is linked, directly or indirectly, to the actin cytoskeleton. Clarin-1 may also help to maintain a tight coupling of the membranes across the synaptic cleft, bringing together the presynaptic and postsynaptic membranes, and facilitating the tight clustering of GluA2/3 glutamate receptors.

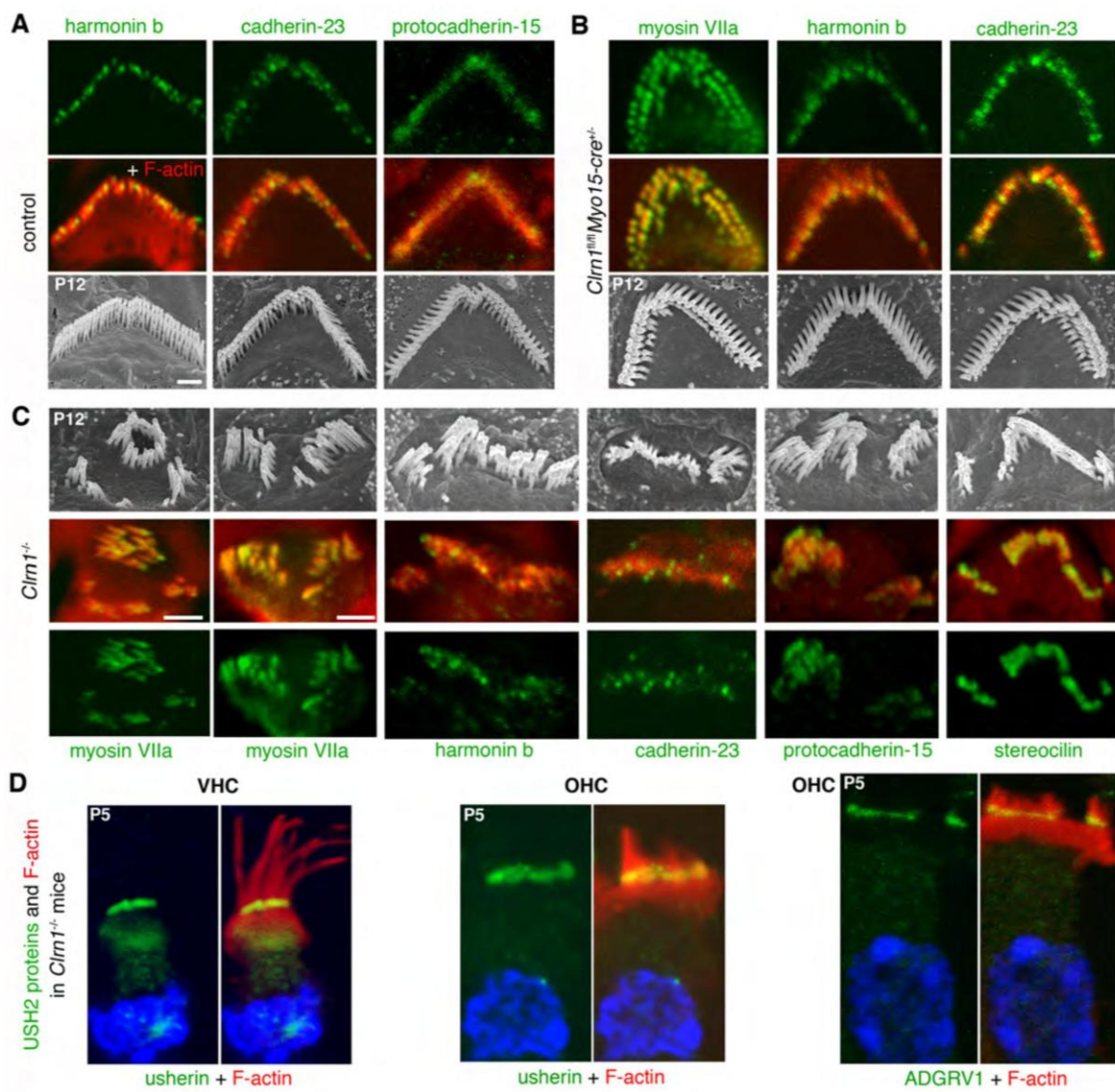
(B) In the absence of clarin-1,  $\text{Ca}_v1.3$  channel clusters expand beyond the presynaptic active zone. This defect in the spatial organization of  $\text{Ca}_v1.3$  channels is associated with the presence of smaller synaptic ribbons and with a dislocation of the synaptic F-actin mesh network. In addition, there is an expanded distribution of GluA2/3 glutamate receptors in the IHC postsynaptic region.

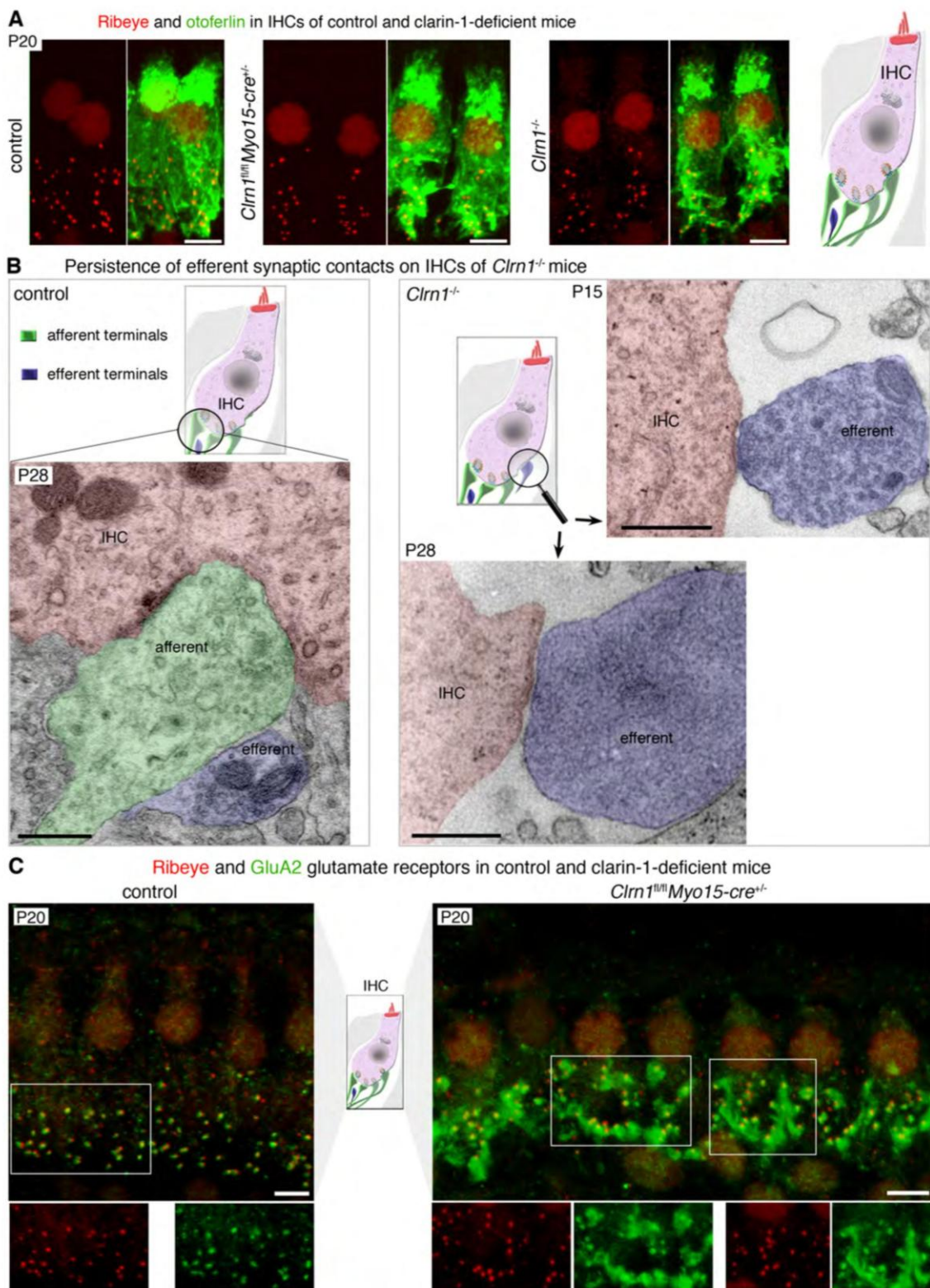




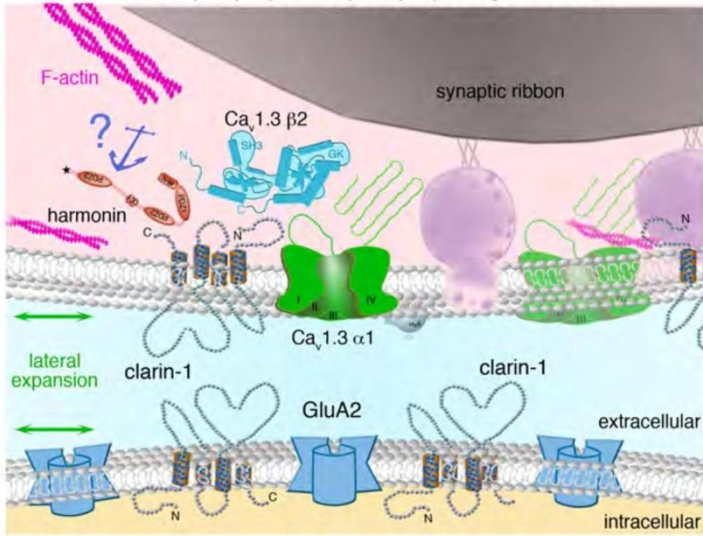








**A** Clarin-1 in the presynaptic and postsynaptic regions of IHCs



**B** Ca<sub>v</sub>1.3 channel complex and GluA2 receptors view under the ribbon

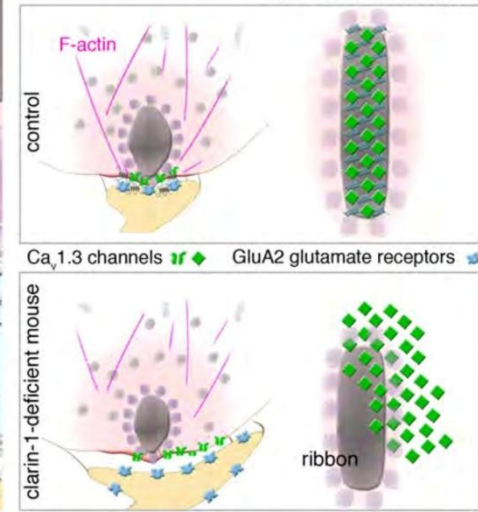




Table S1.1: Properties of Ca<sup>2+</sup> currents in *Clrn1*<sup>-/-</sup> and *Clrn1*<sup>flx/flx</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> IHCs

	<i>Clrn1</i> <sup>+/+</sup> , <i>Clrn1</i> <sup>+/-</sup>		<i>Clrn1</i> <sup>-/-</sup>		<i>Clrn1</i> <sup>fl/fl</sup>				<i>Clrn1</i> <sup>fl/fl</sup> <i>Myo15-cre</i> <sup>+/-</sup>			
	P9 (n=15)	P13 (n=10)	P9 (n=13)	P13 (n=19)	P6 (n=7)	P9 (n=8)	P11 (n=15)	P18-P21 (n=8)	P6 (n=8)	P9 (n=8)	P11 (n=18)	P18-P21 (n=7)
<i>I</i> <sub>Ca<sup>2+</sup></sub> peak amplitude (pA)	240±12	147±8	235±10	225±10	189±29	315±38	185±9	161±11	194±17	356±53	292±14	250±20
<i>I</i> <sub>Ca<sup>2+</sup></sub> peak density (pA/pF)	23.6±0.9	13.4±0.8	25.3±1.3	23.3±1.0	20.3±3.2	33.2±4.0	16.7±0.8	13.1±0.9	20.08±1.8	35.6±5.3	28.4±1.3	28.1±2.2
Half max Voltage Activation V <sub>1/2</sub> (mV)	-26.7±0.1	-27.5±0.2	-28.7±0.2	-29.6±0.2	-30.2±1.2	-29.8±0.3	-28.4±0.2	-26.0±0.3	-28.9±0.9	-32.3±0.5	-31.6±0.2	-33.2±0.5
Boltzman slope S (pA/mV)	6.0±0.1	5.8±0.1	6.0±0.1	5.4±0.1	5.8±0.3	4.7±0.2	4.8±0.2	5.7±0.2	5.8±0.2	4.0±0.3	4.19±0.1	4.2±0.1

Table S1.2: Summary characteristics of exocytosis in *Clrn1*<sup>-/-</sup> and *Clrn1*<sup>flx/flx</sup>*Myo15-cre*<sup>+/-</sup> IHCs

	exocytosis in <i>Clrn1</i> -KO ( <i>Clrn1</i> <sup>-/-</sup> )				exocytosis in <i>Clrn1</i> <sup>fl/fl</sup> <i>Myo15-cre</i> <sup>+/-</sup> IHCs						
	<i>Clrn1</i> <sup>+/+</sup> , <i>Clrn1</i> <sup>+/-</sup>		<i>Clrn1</i> <sup>-/-</sup>		<i>Clrn1</i> <sup>fl/fl</sup>			<i>Clrn1</i> <sup>fl/fl</sup> <i>Myo15-cre</i> <sup>+/-</sup>			
	P9	P13	P9	P13	P9	P13	P18	P9	P13	P18	
RRP Kinetics EGTA 1mM (t in ms)	19±2 (n=11)	12.5±4.5 (n=6)	39±11 (n=6)	25±5* (n=9)	34±10 (n=7)	20±8 (n=11)	25±10 (n=12)	40±8 (n=15)	73±16* (n=16)	102±50* (n=27)	
EGTA 5mM (t in ms)							33±18 (n=11)			205±32* (n=10)	
RRP Ca <sup>2+</sup> efficiency (fF/pA)	0.04 ±0.02 (n= 11)	0.13 ±0.01 (n= 6)	0.04 ±0.01 (n= 4)	0.04 ±0.01* (n=9)	0.06 ±0.1 (n= 5)	0.16 ± 0.01 (n=10)	0.16 ± 0.01 (n=15)	0.05 ± 0.01 (n=15)	0.07 ±0.01* (n=11)	0.08 ± 0.01* (n=25)	
N power fit	1.35±0.1	0.54±0.2	1.38±0.2	1.0±0.1	0.8±0.4	0.8±0.1	0.71±0.1	0.8±0.2	0.9±0.1	0.71±0.1	

Table S2.1 : Properties of Ca<sup>2+</sup> currents in *Cln-1*<sup>-/-</sup> AAV2/8 rescue IHCs

\* Statistical difference with p<0.05 (t-test) for *Cln-1*<sup>-/-</sup> and p values in parenthesis for the rescue as compared to control.

	<b>Control</b> <i>Cln-1</i> <sup>+/+</sup> , <i>Cln-1</i> <sup>-/-</sup> (AAV2/8- <i>Cln-1</i> )	<i>Cln-1</i> <sup>-/-</sup>	<b>Rescue</b> <i>Cln-1</i> <sup>-/-</sup> (AAV2/8- <i>Cln-1</i> )
	P15-P18 (n = 9)	P15-P18 (n = 9)	P15-P18 (n = 16)
<b>I<sub>Ca</sub> peak amplitude (pA)</b>	175.7 ± 9.9	255.1 ± 23*	159.6 ± 12.3 (p = 0.39)
<b>Half max voltage activation V<sub>1/2</sub> (mV)</b>	- 24.9 ± 1.3	- 30.8 ± 1.6*	- 22.9 ± 0.9 (p = 0.23)
<b>Boltzman slope S (pA/mV)</b>	5.87 ± 0.13	4.51 ± 0.15*	5.60 ± 0.12 (p = 0.16)

Table S2.2: Summary characteristics of exocytosis in *Cln-1*<sup>-/-</sup> AAV2/8 rescue IHCs

\* Statistical difference with p<0.05 (t-test) for *Cln-1*<sup>-/-</sup> and p values in parenthesis for the rescue as compared to control.

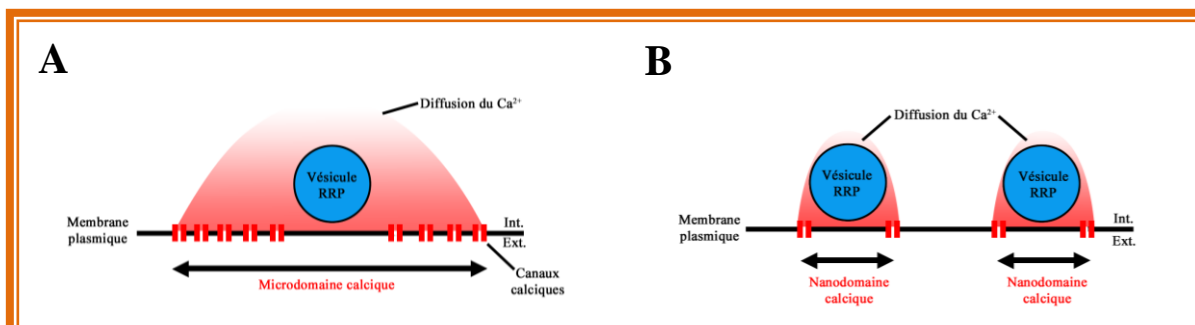
	<b>Control</b> <i>Cln-1</i> <sup>+/+</sup> , <i>Cln-1</i> <sup>-/-</sup> (AAV2/8- <i>Cln-1</i> )	<i>Cln-1</i> <sup>-/-</sup>	<b>Rescue</b> <i>Cln-1</i> <sup>-/-</sup> (AAV2/8- <i>Cln-1</i> )
	P15-P18 (n=9)	P15-P18 (n=9)	P15-P18 (n=16)
<b>Kinetics:</b> <b>RRP exocytosis rate (linear fit over the first 40 ms) (pF/s)</b>	0.37 ± 0.06	0.15 ± 0.03*	0.36 ± 0.05 (p = 0.9)
<b>RRP Ca<sup>2+</sup> efficiency (fF/pA)</b>	0.17 ± 0.02	0.07 ± 0.01*	0.18 ± 0.01 (p = 0.8)

# **Discussion**



## 1. L'organisation spatiale des canaux calciques au ruban

L'imagerie confocale haute résolution par la technique du STED (Stimulated Emission Depletion) a permis de définir l'organisation spatiale des canaux calciques Cav1.3 au niveau des zones actives (ZAs) des CCI. Ces canaux apparaissent regroupés en bandes étroites sous le ruban (Wong *et al.*, 2014; Rutherford, 2015). Notre étude a pu confirmer que ces canaux calciques sont organisés en nanodomains, dont l'ensemble forme une ellipse allongée sous le ruban (**Fig. 27** et **Fig. 28**; article 1: Vincent *et al.*, 2014). Cet agencement particulier des canaux Cav1.3 permettrait une augmentation focalisée du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire au voisinage des vésicules. En d'autres termes, cette organisation rapprochée permettrait d'associer la probabilité de fusion vésiculaire à la probabilité d'ouverture du canal calcique (Brandt *et al.*, 2005).

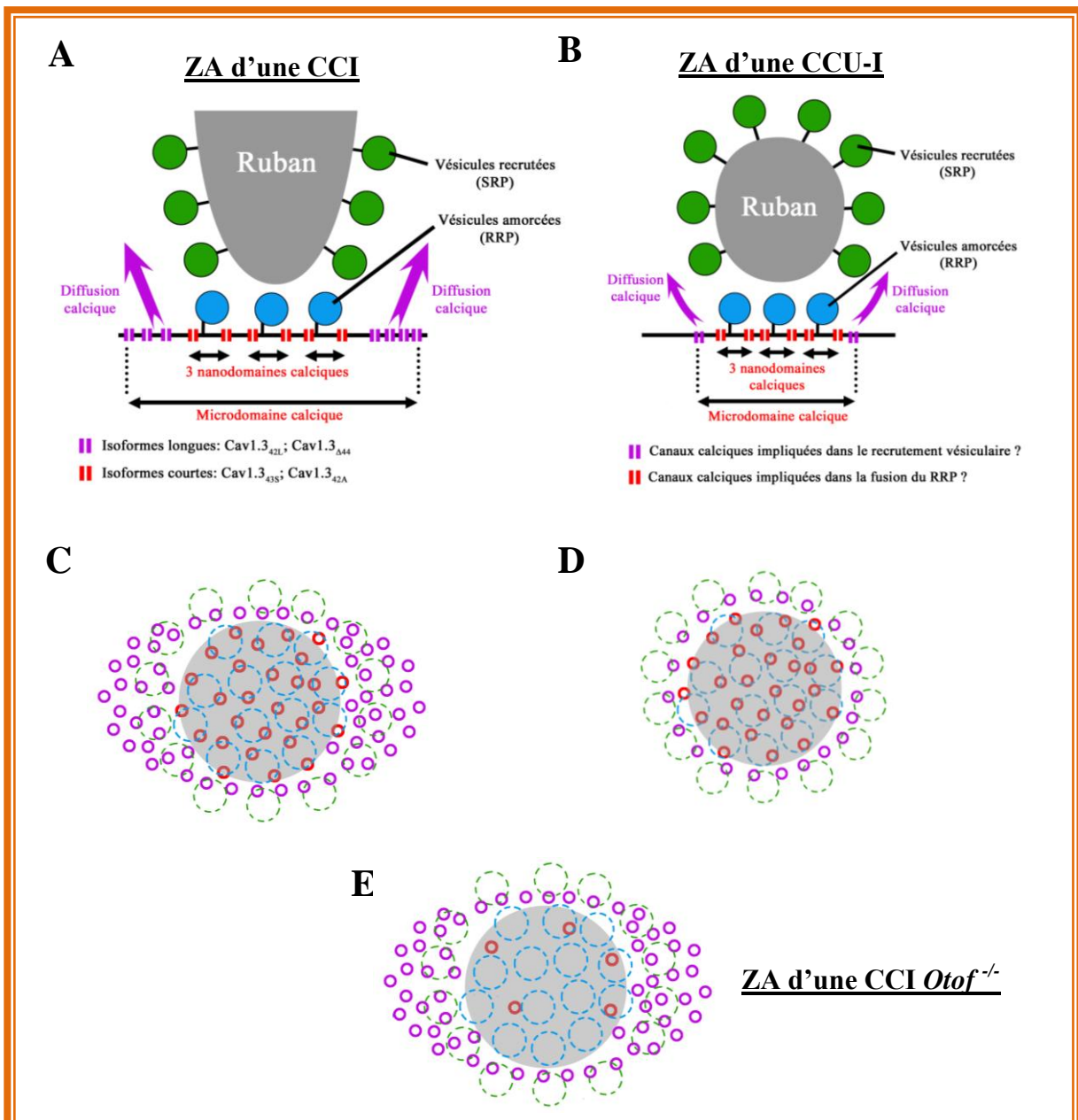


### Figure 27: Hypothèses de configuration en microdomaine et nanodomaine des canaux calciques dans les zones actives des cellules sensorielles de l'oreille interne

En configuration microdomaine (**A**), la distance moyenne des canaux calciques par rapport au site de fusion est micrométrique conférant une sensibilité de l'exocytose à l'EGTA et une moins bonne efficacité calcique (*i.e.* quantité de vésicules fusionnées / quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  entrant). La configuration en nanodomaine calcique (**B**) est uniquement sensible au BAPTA, un chélateur rapide du  $\text{Ca}^{2+}$ . Nos résultats suggèrent que les CCI présentent une distance moyenne entre les canaux Cav1.3 et les vésicules de  $\sim 70$  nm alors que celle des CCU-I est  $\sim 47$  nm. Cette organisation moins resserrée des canaux calciques au niveau des CCI permettrait une diffusion plus lointaine du  $\text{Ca}^{2+}$

De manière surprenante, nous avons observé que les CCU-I ont, en apparence, une meilleure efficacité calcique de l'exocytose du RRP par rapport aux CCI ( $\sim 2,5$  fois), c'est-à-dire qu'à même niveau d'exocytose il y a 2,5 fois moins de  $\text{Ca}^{2+}$  entrant dans les ZAs des CCU-I. Puisque nous avons trouvé une affinité calcique similaire pour le senseur calcique des CCU-I ( $3,3 \mu\text{M}$ ) et des CCI ( $4,0 \mu\text{M}$ ), la différence d'efficacité calcique de l'exocytose entre ces deux types cellulaires ne s'explique pas par l'expression de senseurs calciques spécifiques.

Cette différence pourrait alors provenir d'une organisation spatiale spécifique des canaux calciques. Nous avons démontré pour la première fois que les zones actives des cellules vestibulaires (CCU-I) présentaient, elles aussi, une organisation resserrée des canaux Cav1.3 à leur ruban. Cependant, la distance moyenne estimée entre les canaux Cav1.3 et les sites de fusion était plus faible au niveau des CCU-I en comparaison à celle des CCI ( $45$  vs  $70$  nm). L'imagerie confocale STED montre effectivement une distribution circulaire réduite des canaux Cav1.3 sous les rubans des CCU-I. Cette distribution plus resserrée des canaux Cav1.3 pourrait donc expliquer la meilleure efficacité calcique apparente de l'exocytose observée dans les CCU-I (**Fig. 28**, article 1: Vincent *et al.*, 2014).



**Figure 28: Organisation des canaux calciques au niveau des zones actives des CCI et des CCU-I.** Schéma représentant une zone active en vue transversale dans une CCI (A) et une CCU-I (B). En C et D vue du dessus d'une zone active de CCI et de CCU-I, respectivement. Dans les CCI, les canaux calciques ont une double distribution. Les isoformes courtes des canaux Cav1.3 (en rouge) sont organisées en nanodomaine et régule la fusion du RRP (vésicules bleues). Les isoformes longues des canaux Cav1.3 (en violet) plus éloignées du ruban sont impliquées dans le recrutement vésiculaire (vésicules vertes). Il est à noter qu'en B, pour les CCU-I, l'organisation des canaux calciques est plus resserrée, avec une moins grande proportion de canaux calciques dédiés au recrutement. L'expression des isoformes courtes et longues du canal Cav1.3 reste à déterminer. En E, dans les zones actives des CCI *otof*<sup>-/-</sup>, les isoformes courtes des canaux Cav1.3 sont moins exprimées. (Note: Le ruban de forme ellipsoïdale de la CCI a été volontairement coupé pour faciliter la représentation). Les liens ("tethers") permettent d'ancrer les vésicules au ruban et à la membrane plasmique (Vogl *et al.*, 2015).

Comme le suggère notre étude sur l'identification des isoformes des canaux Cav1.3 exprimées par les CCI (article 2), seule une partie des canaux Cav1.3 (25 %) participe à la fusion du RRP. La majeure partie des canaux Cav1.3 serait impliquée dans le recrutement vésiculaire (SRP). Cette proportion de canaux SRP/RRP reste à déterminer au niveau des cellules vestibulaires, mais il se pourrait que la proportion de canaux participant à la fusion du RRP soit plus élevée au niveau des CCU-I.

Quel est le rôle physiologique d'une organisation plus ou moins resserrée des canaux Cav1.3 sous le ruban des cellules ciliées ?

Les CCI sont capables d'encoder des signaux acoustiques complexes pouvant s'étendre sur une large bande fréquentielle (20 Hz à 20 kHz chez l'Homme) et sur une grande dynamique d'intensité (20 à 120 dB SPL). Le "phase-locking", c'est-à-dire la concordance de phase entre le signal acoustique et les signaux électriques (potentiels d'action) des fibres du nerf auditif, peut aller jusqu'à plusieurs kHz. Au contraire, les cellules vestibulaires encodent des signaux de faibles fréquences et dynamiques: les mouvements de la tête (accélérations linéaires et angulaires; Songer and Eatock, 2011). Les décharges électriques des fibres vestibulaires oscillent en phase avec les accélérations sur une faible dynamique de quelques dizaines de Hz autour d'une fréquence de repos d'environ 100 Hz.

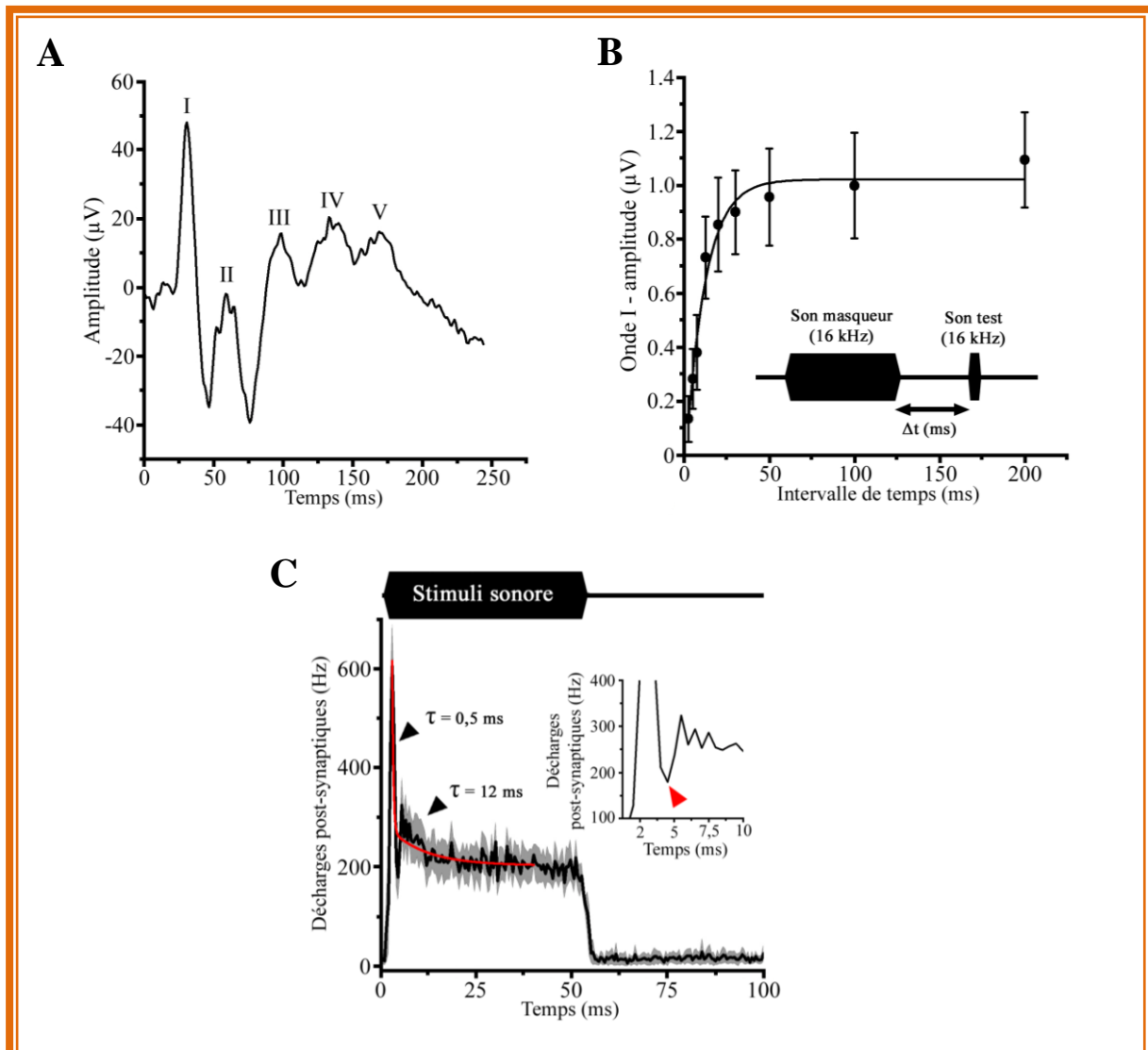
Ces spécificités d'encodage du signal pourraient s'expliquer notamment par une régulation différente de la diffusion du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire lors de l'activation des canaux calciques au niveau pré-synaptique. En effet, le ruban et les vésicules elles-mêmes, ont été proposés comme jouant le rôle de barrière physique de diffusion du  $\text{Ca}^{2+}$ , permettant ainsi de concentrer les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sous le ruban (Graydon *et al.*, 2011). Nos résultats ont montré la présence d'une grande proportion de canaux calciques en périphérie du ruban dans les CCI au contraire des cellules vestibulaires qui présentent l'essentiel de leurs canaux calciques concentrés sous le ruban (**Fig. 28** ; article 1: Vincent *et al.*, 2014). Il est aussi à noter que la taille des CCI est deux fois plus importante que celle des CCU-I. De plus, les rubans des CCI sont plus allongés et pénètrent plus en profondeur dans la cellule. Ces canaux calciques, en périphérie du ruban des CCI, permettraient un recrutement de vésicules plus éloignées des sites de fusion.

Par ailleurs, une organisation moins resserrée des canaux calciques sous le ruban permettrait une augmentation plus graduelle du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire en fonction du voltage, c'est-à-dire une saturation plus progressive du senseur calcique. Ceci pourrait expliquer la plus grande dynamique de réponse des synapses à rubans des CCI. Notamment, il a été montré que la distance parcourue par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  depuis la bouche des canaux calciques est régulée par la présence de tampon calcique endogène (Naraghi and Neher, 1997). Ainsi, une faible concentration en tampons calciques endogènes (calcineurine, calrétinine et parvalbumine) dans les CCI, pourrait aussi renforcer la réponse graduée des CCI (Hackney *et al.*, 2005).

Dans de nombreuses autres synapses, telles que celles du système nerveux central (Bucurenciu *et al.*, 2008; Scimemi and Diamond, 2012; voir revue: Eggermann *et al.*, 2012) ou celles des photorécepteurs (Mercer *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013), l'efficacité de la transmission synaptique dépend de l'organisation spatiale des canaux calciques dans les zones actives. Autrement dit, la distance (microdomaine vs nanodomaine) entre les canaux calciques pré-synaptiques et les vésicules du RRP est importante pour réguler la vitesse et l'efficacité de la fusion vésiculaire.

## 2. Les CCI<sub>s</sub> expriment différentes isoformes du canal Cav1.3

L'enregistrement *in vivo*, des vitesses de décharge des fibres afférentes du nerf auditif, en réponse à différentes stimulations sonores, montre une adaptation très rapide (environ 0,5 ms) suivie par une adaptation lente (environ 12 ms) et une réponse soutenue pendant toute la durée de la stimulation. On note aussi la présence d'un rebond (flèche rouge, **Fig. 29C**, encart) faisant penser à une inactivation très rapide et transitoire dont l'origine reste inconnue.



**Figure 29: Activités électriques évoquées des fibres afférentes auditives enregistrées *in vivo*, chez la souris**

(A) Exemple d'un enregistrement des potentiels évoqués (ABR) en réponse à un bruit blanc. (B) "Forward Masking": atténuation de l'amplitude de l'onde I (activité électrique de la synapse entre les CCI<sub>s</sub> et les fibres afférentes) par une pré-stimulation acoustique (masqueur) ; appliquée avec des intervalles de temps variables entre 2,5 et 200 ms. (C) Moyenne de l'activité de 16 fibres afférentes enregistrées séparément en réponse à des sons de 100 ms et de fréquences comprises entre 18 et 24 kHz. L'intensité du signal a été placée à 40 dB au dessus du seuil de réponse de chaque fibre. L'encart est le zoom des 10 premières ms. La flèche rouge représente une inactivation très transitoire du signal. (C, Didier Dulon, résultats non publiés).

L'origine de la phase d'adaptation rapide (**Fig. 29C**) ne semble pas être liée à la désensibilisation des récepteurs AMPA. En effet, des mesures *in vitro* en présence de cyclothiazide, empêchant la désensibilisation des récepteurs glutamatergiques, montre aussi cette composante rapide dans l'adaptation des réponses post-synaptiques (Goutman and Glowatzki, 2007). De même, nous pouvons exclure la participation d'une adaptation du potentiel microphonique dans cette adaptation neurale (Palmer and Russel, 1986). L'origine de l'adaptation neurale a été postulée comme provenant majoritairement d'un épuisement du RRP au niveau des CCI. Cette hypothèse est renforcée par nos études *in vivo*, visant à analyser la capacité des CCI à répondre à deux sons successifs de fréquences identiques et d'intensités proches par le protocole de masquage (ou « forward masking », Song *et al.*, 2007; **Fig. 29B**). Ces résultats démontrent que l'intervalle de temps pour générer une exocytose d'amplitude équivalente à la précédente est compris entre 10 et 20 ms, c'est-à-dire proche des constantes de temps de la phase lente (~12 ms) de l'adaptation neurale.

Jusqu'à présent, l'ensemble des études portant sur l'adaptation neurale des fibres afférentes du nerf auditif excluait une régulation au niveau des canaux calciques. En effet, le courant global calcique des CCI présente peu ou pas d'inactivation (Zampini *et al.*, 2014). Cependant, notre étude démontre que le courant calcique global des CCI contient une petite composante, présentant une inactivation rapide. Cette composante serait portée par les isoformes Cav1.3<sub>43S</sub> et Cav1.3<sub>42A</sub> (Article 2). Nous proposons que l'inactivation rapide de ces isoformes courtes des Cav1.3 pourrait expliquer en partie l'adaptation neurale. Ces isoformes courtes Cav1.3<sub>43S</sub> et Cav1.3<sub>42A</sub> contrôleraient la fusion du RRP.

Les caractéristiques biophysiques de ces isoformes courtes du canal Cav1.3 ont été étudiées en les co-exprimant avec la sous-unité  $\beta$  dans les cellules HEK (Bock *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011) et TsA-201 (Scharinger *et al.*, 2015). Ces études montrent que les cinétiques d'inactivation des isoformes courtes sont plus rapides que celles des isoformes longues (**Fig. 26B et Fig. 26C**, introduction). De plus, il a été montré un décalage du potentiel de demi-activation ( $V_{1/2}$ ) du courant calcique vers les valeurs négatives. L'analyse de nos courants calciques résistant à la nifédipine (isoformes courtes), obtenus dans un contexte cellulaire plus physiologique, où le canal calcique est en présence de l'ensemble de ses sous-unités régulatrices, n'a montré aucun décalage de la dépendance au voltage ( $V_{1/2}$ ). Ce résultat est en accord avec l'étude Scharinger (2015) montrant que les courants calciques des CCI Cav1.3-HA ne présentent aucune variation de leur  $V_{1/2}$ . Comme indiqué dans mon introduction, le modèle murin Cav1.3-HA permet de mimer indirectement l'absence de la partie C-terminale (isoformes courtes) en empêchant la formation du domaine régulateur C-terminal. Les cinétiques d'inactivation que nous avons obtenues en présence de nifédipine (~ 4 ms) se rapprochent de celles obtenues chez le rat (Grant and Fuchs, 2008), chez la grenouille (Schnee and Ricci, 2003), chez le modèle murin Cav1.3-HA (Scharinger *et al.*, 2015) et sont plus rapides que celles obtenues sur le courant global (~ 60 ms). L'ensemble de nos résultats suggère fortement que le courant calcique, à l'origine de la fusion du RRP est porté par les isoformes courtes Cav1.3<sub>43S</sub> et Cav1.3<sub>42A</sub> alors que le recrutement vésiculaire est porté par les isoformes longues Cav1.3<sub>42L</sub> et Cav1.3<sub>44</sub>. Cette conclusion est renforcée par la diminution de l'expression des isoformes courtes (Cav1.3<sub>43S</sub> et Cav1.3<sub>42A</sub>) associée à la diminution de l'amplitude de la cinétique d'inactivation rapide chez les souris *Otof*<sup>-/-</sup>.

L'avantage d'utiliser des isoformes du canal Cav1.3 présentant des cinétiques d'inactivation variable, selon leur position au ruban, permettrait à la cellule de contrôler efficacement la quantité de  $Ca^{2+}$  entrant au niveau des sites de fusion. Ainsi les isoformes courtes Cav1.3<sub>43S</sub> et Cav1.3<sub>42A</sub> permettent une augmentation très locale du  $Ca^{2+}$  intracellulaire, proche des vésicules, déclenchant la fusion du RRP. Les isoformes longues Cav1.3<sub>42L</sub> et Cav1.3<sub>44</sub>, s'inactivant plus lentement, contrôlerait la diffusion du  $Ca^{2+}$

intracellulaire, régulant ainsi le recrutement des vésicules. Ces différentes isoformes courtes ont été aussi retrouvées dans le tissu cardiaque, le cerveau et la rétine (Singh *et al.*, 2008). Cependant, leur rôle physiologique n'est pas encore défini. Les isoformes courtes, de part leur inactivation rapide, permettraient de limiter l'accumulation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans le cas de stimulations répétées.

Pour le moment, les isoformes des canaux calciques dans les cellules ciliées vestibulaires sont inconnues. L'utilisation de bloqueurs telles que la nifédipine ou la nimodipine n'a mis en évidence qu'un blocage partiel (50 %) du courant calcique (Dou *et al.*, 2004) comparé aux 90 % dans les CCI (Brand *et al.*, 2003). Ceci suggère l'expression de multiples familles de canaux calciques par les cellules sensorielles vestibulaires, expression confirmée par différentes études (Nie *et al.*, 2008; Su *et al.*, 1995; Martini *et al.*, 2000).

### 3. Régulation des canaux Cav1.3 par la libération des protons lors de l'exocytose

L'inactivation transitoire des canaux calciques ( $\text{I}_{\text{CaTB}}$ ) par l'accumulation de protons ( $\text{H}^+$ ) dans la fente synaptique a été observée dans les photorécepteurs et dans les cellules ciliées des amphibiens (DeVries, 2001; Cho and von Gersdorff, 2014). Une telle régulation au niveau des cellules ciliées des mammifères n'avait jamais été montrée. Nos résultats montrent pour la première fois que l' $\text{I}_{\text{CaTB}}$  au niveau des CCI est linéairement corrélée à l'exocytose. Remarquablement, cette régulation  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  par les protons est absente dans les CCI immatures, cellules où les canaux calciques ne sont pas organisés en nanodomains sous les rubans (Wong *et al.*, 2014). Nos résultats suggèrent qu'une proximité nanométrique entre les canaux Cav1.3 et les sites de fusions est nécessaire pour la régulation par les protons sécrétés en extracellulaire (**Fig. 27B** et **Fig. 28A**).

Quel serait le rôle physiologique de cette régulation par les protons lors de l'exocytose des CCI ?

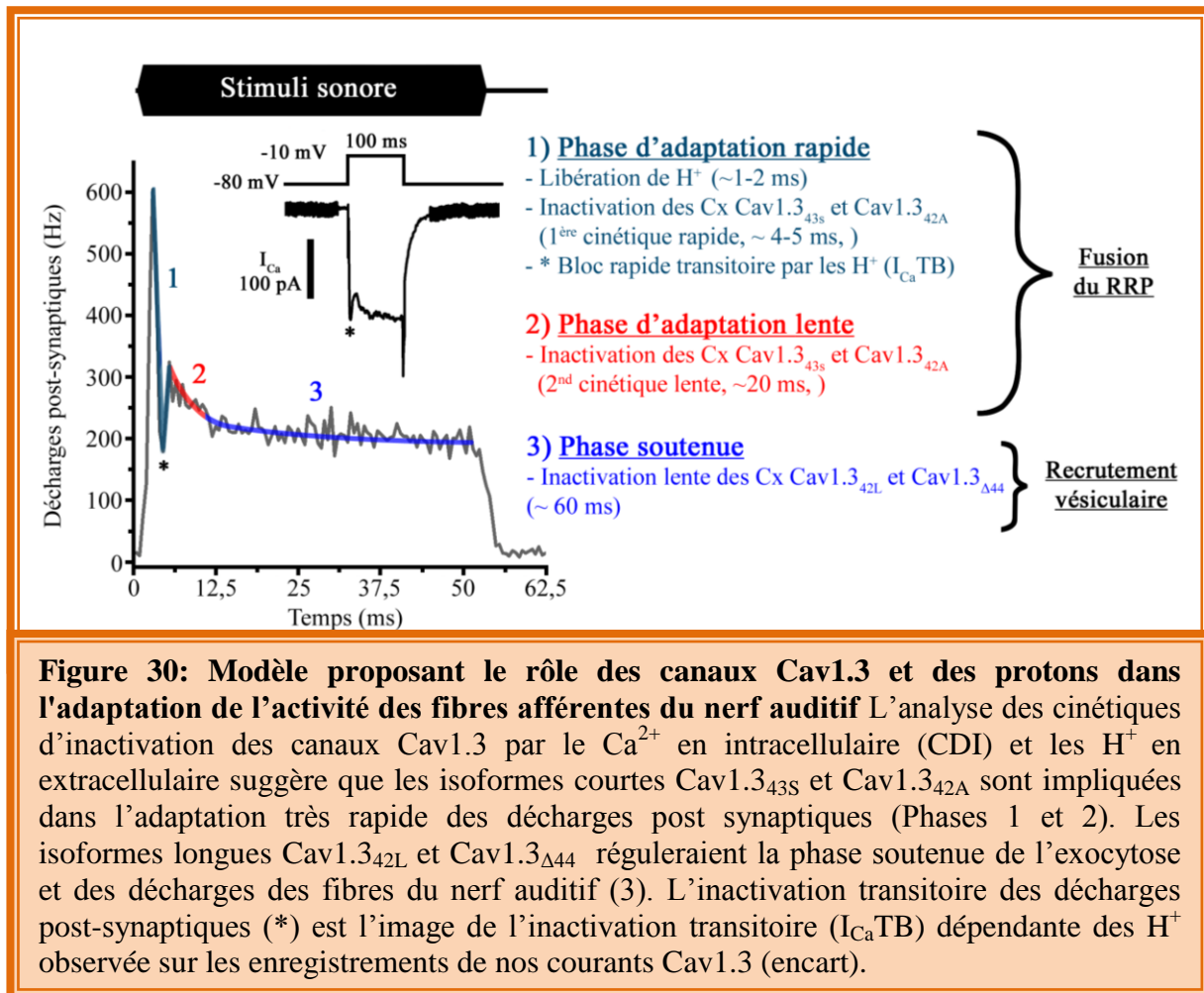
L'effet du pH extracellulaire sur les canaux calciques est connu depuis très longtemps (Zhou and Jones, 1996). En plus de réguler la sensibilité au voltage des canaux calciques (Zhou and Jones, 1996), il a été proposé que le relargage conjoint du neurotransmetteur chargé (tel que le glutamate) avec une particule chargée (tel que les protons) permettraient d'accélérer la libération du neurotransmetteur lors de la formation du pore de fusion (Khanin *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2010). Néanmoins, le rôle physiologique d'une telle régulation n'est pas encore clairement compris.

Au niveau de CCI, cette régulation par les  $\text{H}^+$  pourrait être essentielle dans l'adaptation rapide des réponses électriques des fibres nerveuses auditives. L'inactivation des canaux Cav1.3 directement déclenchée par les protons, offre la possibilité aux CCI de réguler leur activité de fusion vésiculaire dans un intervalle de temps proche de la milliseconde en limitant l'accumulation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu intracellulaire, et ce directement en relation avec l'importance de l'exocytose. Remarquablement, cette régulation par les  $\text{H}^+$  extracellulaires vient s'ajouter à l'inactivation du courant calcique par le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (IDC). Cette double régulation permettrait à la CCI de réguler plus finement la concentration calcique intracellulaire aux sites de fusion vésiculaire et ainsi permettre d'assurer un « phase locking » jusqu'à 1-2 kHz.

Le processus du « phase locking », qui requiert une très grande précision temporelle, pourrait être aussi facilité par l'accélération de la libération du glutamate par les variations du gradient de  $\text{H}^+$  s'établissant lors de la formation du pore de fusion.

Cette double régulation au niveau des canaux calciques éviterait aussi un épuisement du RRP et permettrait ainsi aux cellules de pouvoir répondre efficacement lors de longues stimulations répétées. Un épuisement du RRP comme mécanisme d'adaptation des réponses électriques des fibres du nerf auditif impliquerait une période réfractaire (dépendant du recrutement vésiculaire) qui nuirait à la fois au processus du « phase locking » et à la rapidité des mécanismes de détection interaurale du son dans l'espace.

De plus, ce double contrôle des canaux calciques pourrait participer aux mécanismes de protections des CCI lors de stimulations acoustiques à fortes intensités.





## 4. Un processus de fusion uni ou multi-vésiculaire au niveau des zones actives synaptiques des CCI ?

Comme indiqué dans le chapitre 8 de mon introduction, le mode de fusion utilisée par les synapses à ruban des CCI, est une question encore débattue. Un mode de fusion multi-vésiculaire (MVR) a été proposé dans les années 2000 pour expliquer la nature des EPSCs enregistrés au niveau des terminaisons en bouton des fibres afférentes du nerf auditif (Glowatzky and Fuchs, 2002; Grant *et al*, 2010). Un mode de fusion MVR a aussi été proposé dans les cellules sensorielles de la rétine (voir revue: von Gersdorff and Matthews, 1999 et Singer, 2007). Récemment, une équipe a proposé que le mode de fusion uni-vésiculaire (UVR) serait le plus adapté à la fonction des CCI en permettant de maintenir un stock constant de vésicules à la membrane (Chapochnikov *et al.*, 2014).

### 4.1 L'otoférine synchronise-t-elle la fusion multi-vésiculaire ?

L'analyse de l'amplitude des événements  $I_{CaTB}$  spontanés et évoqués suggère que chaque ruban de CCI est capable de déclencher la fusion simultanée de 2 à 9 vésicules. Un argument supplémentaire en faveur du MVR est l'observation d'une corrélation entre l'amplitude de l' $I_{CaTB}$  et son décours temporel. En effet, plus l'amplitude de l' $I_{CaTB}$  est élevée plus sa durée est grande, suggérant une diminution de synchronisation vésiculaire pour les plus grands événements. Dans le cas d'un mécanisme UVR, on devrait retrouver une corrélation inverse entre l'amplitude et la durée de chaque événement  $I_{CaTB}$ .

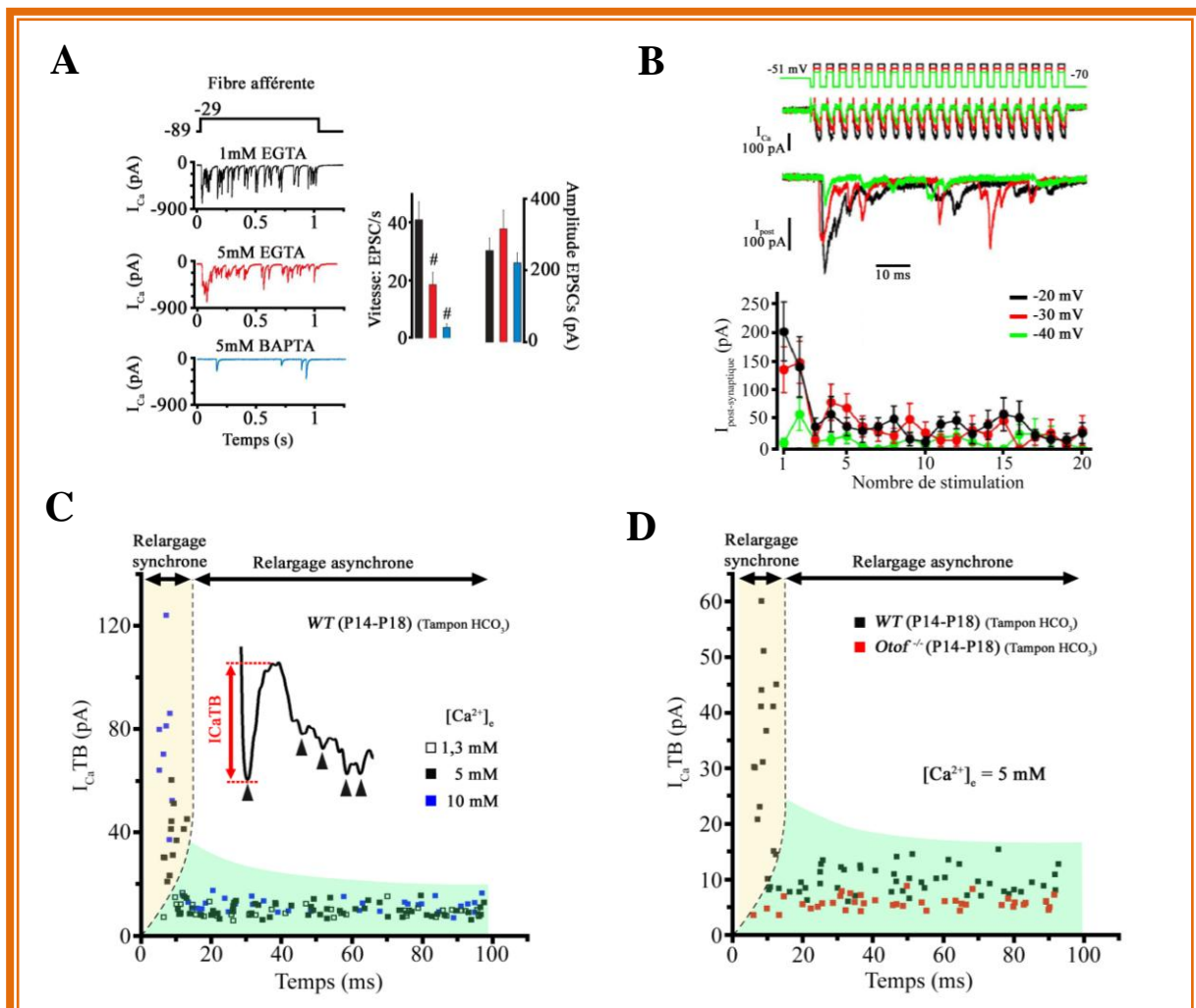
Les CCI *Otof*<sup>-/-</sup> présentent une exocytose réduite. A valeur d'exocytose comparable à celle des CCI sauvages, on n'observe pas d' $I_{CaTB}$  chez les CCI *Otof*<sup>-/-</sup>. Ceci suggère une désynchronisation de la fusion vésiculaire en absence d'otoférine, de manière identique à l'effet du BAPTA intracellulaire. Cependant, nous avons observé par RT-PCR, une diminution de l'expression des isoformes courtes des canaux Cav1.3 en absence d'otoférine. Il est donc envisageable que la diminution de l'amplitude de l' $I_{CaTB}$  dans les CCI *Otof*<sup>-/-</sup> soit simplement liée à la diminution de l'expression de ces isoformes courtes du canal Cav1.3, isoformes que l'on sait associées à la fusion du RRP.

A ce stade, nous ne pouvons conclure si la désynchronisation de la fusion vésiculaire chez les CCI *Otof*<sup>-/-</sup> est liée à la réduction des isoformes courtes du canal Cav1.3 ou à l'absence de l'otoférine.

### 4.2 MVR ou UVR: Avantages et inconvénients pour les CCI

Le mécanisme UVR a l'avantage de réduire considérablement le besoin d'apport vésiculaire aux sites de fusion (Chapochnikov *et al.*, 2014). Les impératifs de fiabilité et de vitesse de la transmission synaptique des CCI apparaissent incompatibles avec le mode UVR. En effet, le "phase locking" requière la fusion d'au moins une vésicule à chaque cycle de dépolarisation pour générer un train de potentiels d'action en phase avec le signal acoustique. Si l'on tient compte de la probabilité de fusion d'une vésicule qui n'est pas égale à 1, le model UVR ne permet pas de répondre à cet impératif temporel avec exactitude. Le model MVR permettrait aux CCI d'assurer plus efficacement la fusion d'au moins une vésicule compétente à chaque cycle de stimulation. La synchronisation de la fusion de plusieurs vésicules confère à l'exocytose une plus grande dynamique de réponse. Un autre avantage qu'offre le MVR est d'assurer que la majorité des récepteurs AMPA post-synaptiques soit activée par la libération du glutamate, ce qui est difficilement envisageable par la fusion d'une seule vésicule. L'équipe de Tobias Moser propose que l'UVR est aussi capable d'assurer cette dynamique par la modulation de la taille et la cinétique de l'ouverture

du pore de fusion. Cependant, cette interprétation est issue de l'analyse des EPSC spontanés des fibres afférentes. A l'heure actuelle on ne peut pas exclure que les deux modèles de fusion interviennent. Si l'on considère que chaque zone active des CCI est composée de plusieurs sites de fusion indépendants, la fusion MVR proviendrait de la synchronisation de l'ensemble de ces sites où intervient un mécanisme d'UVR.



### Figure 31: La $Ca^{2+}$ dépendance de la fusion vésiculaire synchrone et asynchrone

(A) A gauche, enregistrement des courants post-synaptiques (EPSCs) en présence de 1 mM EGTA (noir), 5 mM EGTA (rouge) et 1 mM BAPTA (bleu), en réponse à une dépolarisation d'1s. A droite, analyse de l'amplitude et de la fréquence des EPSCs dans les trois conditions de tampon calcique. Seule la fréquence des EPSCs varie (Goutman and Glowatzki, 2007). (B) Enregistrement pré- (courant calcique;  $I_{Ca}$ ) et post-synaptique (EPSCs;  $I_{post}$ ) en réponse à un train de dépolarisation depuis -70 mV jusqu'à -40 (vert), -30 (rouge) et -20 mV (noir). Notez que l'amplitude de la première réponse (fusion synchrone) varie en fonction du niveau de dépolarisation suggérant une dépendance au  $Ca^{2+}$  de la fusion synchrone. L'amplitude des réponses suivantes est égale pour les 3 niveaux de dépolarisation, suggérant que la fusion asynchrone est indépendante du  $Ca^{2+}$  (Goutman, 2012). (C, D) Analyse de l'amplitude des  $I_{CaTB}$  des souris WT (C) et  $Otof^{-/-}$  (D, rouge) en réponse à 100 ms de dépolarisation depuis -80 mV jusqu'à -10 mV en présence de concentrations croissantes en  $Ca^{2+}$  extracellulaire (C). Les amplitudes de chaque  $I_{CaTB}$  (flèches noires) ont été représentées en fonction du  $Ca^{2+}$  extracellulaire. La fusion synchrone (partie jaune) apparaît dépendante du  $Ca^{2+}$  et de l'otoferline.

### 4.3 La dépendance calcique de l'amplitude des EPSCs

De nombreuses études reposant sur l'enregistrement simultané des activités électriques des fibres afférentes et des courants calciques des CCI, proposent que la fréquence des EPSCs est dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, l'utilisation de 5 mM EGTA ou 5 mM BAPTA réduit considérablement la vitesse de décharges des fibres afférentes connectées aux CCI (**Fig. 31A**, partie droite; Goutman and Glowatzki, 2007). Cependant, les amplitudes des EPSCs ne sont pas affectées en présence de fortes concentrations d'EGTA ou de BAPTA, suggérant qu'elles sont indépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  (Glowatzki and Fuchs, 2002; Goutman and Glowatzki, 2007; Goutman, 2012, **Fig. 31A et Fig. 31B**). Il est difficile de concilier cette  $\text{Ca}^{2+}$  indépendance avec un mode de relargage multi-vésiculaire dans lequel, plus la cellule est dépolarisée plus le nombre de vésicule fusionnant augmente. Lorsque l'on regarde attentivement ces études, on se rend compte que leurs conclusions reposent sur l'analyse des enregistrements post-synaptiques pendant la seconde moitié de la dépolarisation des CCI, c'est-à-dire lorsque la fusion est considérée comme asynchrone. Lorsque l'on regarde la première réponse post-synaptique, reflétant la fusion coordonnée, on observe que l'amplitude de cette réponse augmente avec l'importance de la dépolarisation et est sensible au BAPTA, suggérant donc une  $\text{Ca}^{2+}$  dépendance de la fusion coordonnée, *i.e.* la fusion multi-vésiculaire (**Fig. 31B**).

Nous avons effectué une analyse similaire sur nos courants calciques présentant l' $\text{I}_{\text{CaTB}}$  en présence de différentes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, permettant de faire varier uniquement l'influx calcique et non la probabilité d'ouverture des canaux calciques (**Fig. 31C**). Nous avons utilisé l' $\text{I}_{\text{CaTB}}$  comme un reflet du décours des EPSCs (Cho and von Gersdorff, 2014). Ainsi, nous avons observé que l'amplitude du premier  $\text{I}_{\text{CaTB}}$  (**Fig. 31C**, surligné en jaune), correspondant au premier EPSC (MVR), augmente avec la concentration extracellulaire calcique. Cependant, l'analyse des amplitudes des micro-événements suivant ce premier  $\text{I}_{\text{CaTB}}$ , représentant la fusion asynchrone, ne varie pas avec la concentration extracellulaire calcique (**Fig. 31C**, surligné en vert). De plus, nos expériences chez les souris *Otof*<sup>-/-</sup> montrent que la fusion coordonnée est abolie alors que la fusion asynchrone est légèrement diminuée renforçant l'idée que l'otoferline est importante dans la régulation de la coordination de fusion multi-vésiculaire (**Fig. 31D**).

## 5. Rôle de l'actine dans le trafic vésiculaire et l'organisation spatiale des canaux CaV1.3

Nous avons montré que le réseau d'actine des CCI s forme des cages autour des zones actives. La destruction de ces cages par la latrunculine A, une toxine dépolymérisant l'actine filamenteuse, accélèrent la fusion en facilitant le recrutement vésiculaire des zones actives. Nos résultats suggèrent donc que le réseau d'actine synaptique contrôle le trafic vésiculaire au ruban des CCI s. L'actine-F est bien connue comme jouant ce rôle dans de nombreux types cellulaires telles que les cellules endocrines (Chowdhury *et al.*, 1999; voir revue: Malacombe *et al.*, 2006 ), les cellules caliciformes des voies aérophores (Ehre *et al.*, 2005) et les neurones du système nerveux central (voir revue: Cingolani et Goda, 2008). L'ensemble de ces études suggèrent que l'actine-F formant un réseau étroit permettrait d'isoler les zones actives tout en maintenant à proximité de celles-ci, un pool vésiculaire de réserve. Remarquablement, ce réseau d'actine est également essentiel dans le maintien de l'organisation resserrée des canaux calciques sous les rubans. L'actine pourrait limiter la diffusion des canaux Cav1.3 à l'extérieur des ZAs par des mécanismes restant encore à identifier. Nos résultats suggèrent que la stabilisation du complexe Cav1.3 dans la zone active implique aussi la sous-unité  $\beta 2$ , et les protéines d'Usher harmonine et clarine (article 5). Par ailleurs il est à noter que la whirline, une autre protéine d'Usher, participerait aussi à la stabilisation du complexe Cav1.3 (Kersten *et al.*, 2010). Dans les neurones et les cellules bipolaires de la rétine, l'actine a également été montrée comme régulant l'organisation des canaux calciques tout en les maintenant à l'intérieur des zones actives (Cristofanilli *et al.*, 2007; Mercer *et al.*, 2011; Thoreson *et al.* 2013).

## 6. Pression hydrostatique intracellulaire et actine-F

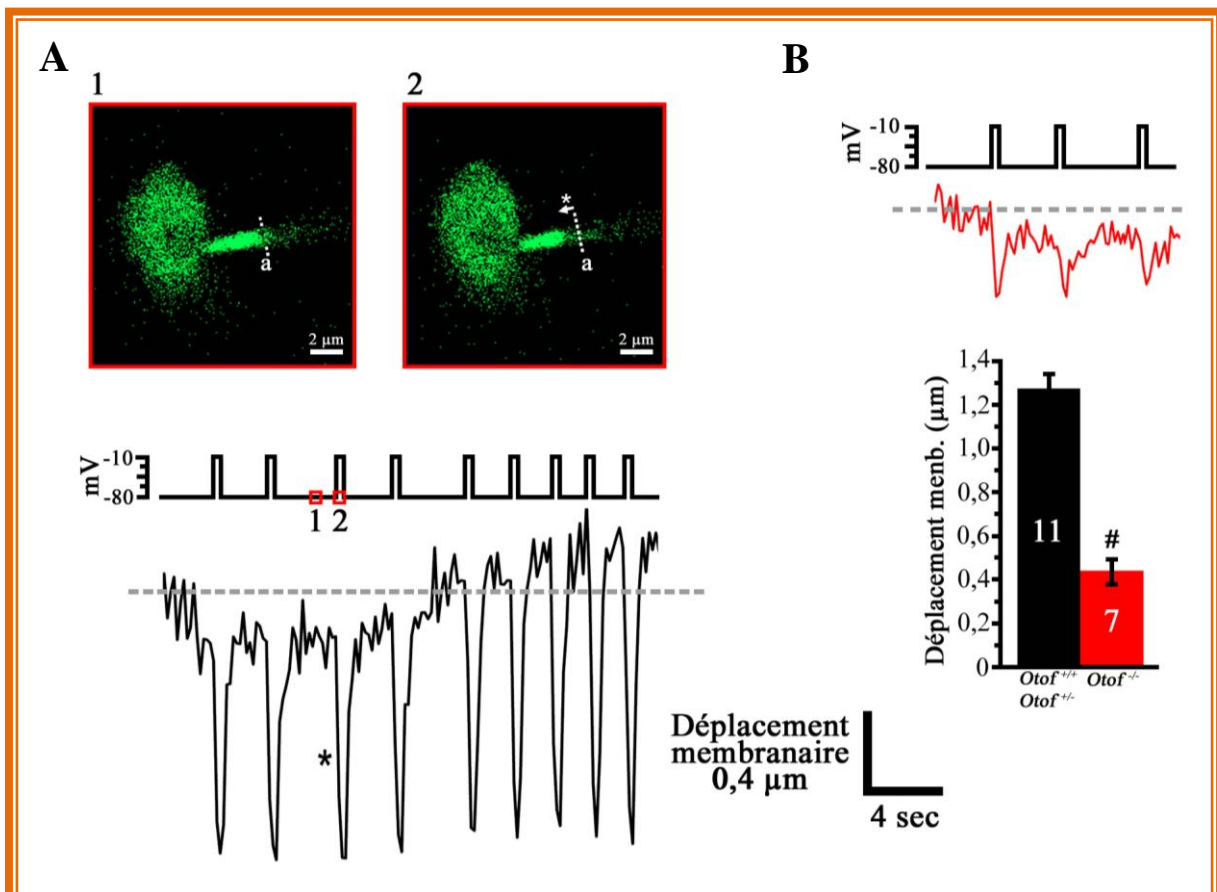
Les cellules se déforment mécaniquement et subissent des variations de pression hydrostatique intracellulaire dans de nombreux processus physiologiques telles que la migration cellulaire (Xue *et al.*, 2010), la mitose (Stewart *et al.*, 2011) et la digestion osseuse par les ostéoclastes (Teitelbaum *et al.*, 2007). La formation de protrusions membranaires tels que les filopodes, lamellipodes ou encore les podosomes est régulée par: 1) l'agencement sous membranaire du réseau d'actine filamenteuse (actine-F), 2) sa tension et 3) sa propriété à maintenir un équilibre entre son état de polymérisation et dépolymérisation. La stimulation des photorécepteurs génère des réponses mécaniques membranaires (Hardie and Franze, 2012). Dans notre étude, nous démontrons que l'exocytose des CCI s est sensible aux variations de la pression hydrostatique intracellulaire. Cette sensibilité osmotique requiert un réseau d'actine intact et l'otoferline.

Nous avons voulu savoir si la fusion vésiculaire des CCI s était capable de générer des variations de pression hydrostatique intracellulaire et en conséquence des réponses mécaniques membranaires.

Pour cela, nous avons dialysé les CCI s avec une sonde fluorescente via la pipette de patch à permis de mesurer les mouvements membranaires. La remontée de la membrane cellulaire dans la pipette de patch crée une accumulation de membrane à la pointe de la pipette (**Fig. 32A**). Nous avons mesuré les déplacements mécaniques sur cette "bulle membranaire" intra-pipette. L'application d'un train de dépolarisations génère des déplacements de la membrane intra-pipette en phase avec la stimulation. Remarquablement, ces réponses mécaniques sont très largement diminuées chez les CCI s *Otof*<sup>-/-</sup> (**Fig. 32B**).

### Comment expliquer ces résultats ?

Nous proposons que la fusion massive de vésicules, dans les zones actives, est capable de produire des variations de pression hydrostatique locales à l'origine des réponses mécaniques enregistrées. Il faudrait maintenant vérifier si ces réponses mécaniques requièrent un cytosquelette d'actine intact à la synapse. On peut imaginer que ces variations de pression hydrostatique générées par l'exocytose constituent une force importante d'attraction du trafic vésiculaire vers les zones actives.



### Figure 32: L'exocytose évoque des réponses mécaniques dans les CCI

(Résultats non inclus dans mes articles)

(A) Les CCI ont été chargées avec l'indicateur fluorescent OGB-2 (vert). Ce marqueur nous permet de visualiser les mouvements membranaires. L'établissement de la configuration « whole cell » provoque une remontée de la membrane cellulaire dans la pipette de patch (ligne pointillée). Cette membrane invaginée dans la pipette de patch, dans laquelle s'accumule l'OGB-2, nous a permis de suivre les mouvements mécaniques membranaires à l'intérieur de la pipette. Un train de dépolarisations membranaires de -80 mV à -10 mV (durée 100 ms, espacée de 100 ms) produit des mouvements mécaniques en phase avec le train de stimulations. (B) Stimulées dans des conditions identiques, les CCI de souris déficientes pour l'otoferline (*Otof*<sup>-/-</sup>; rouge) montrent des réponses mécaniques de faibles amplitudes (inférieure à 30 % des réponses des CCI témoins;  $p < 0,01$ ; noire).

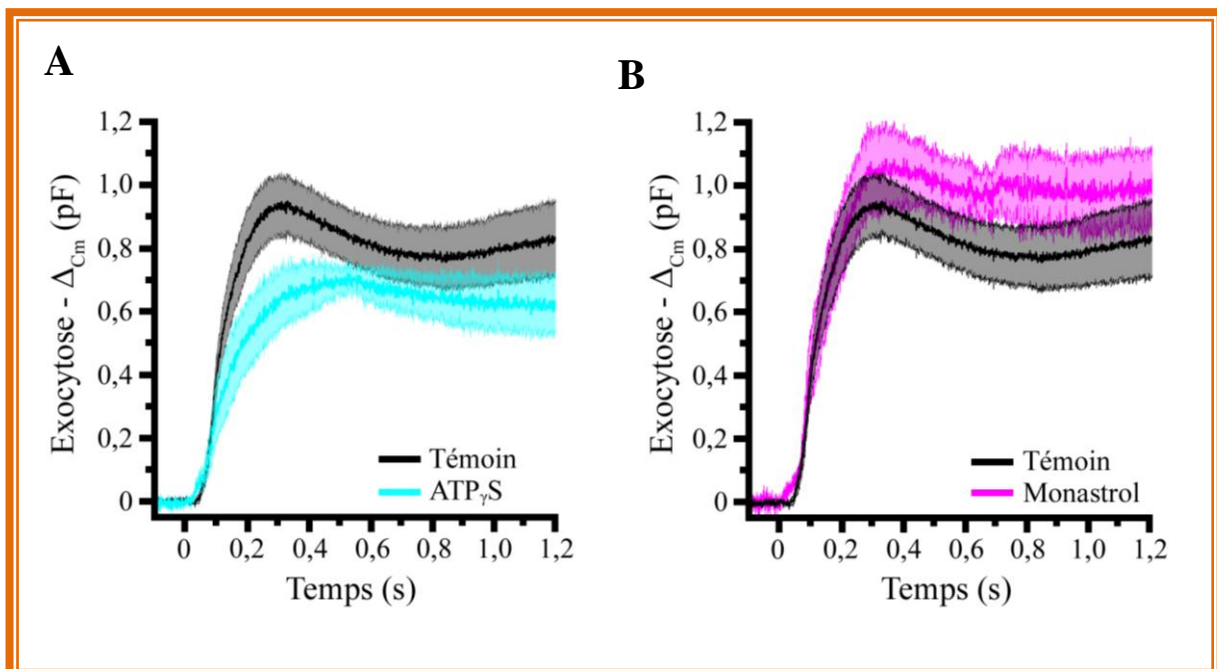
## 7. Rôle de l'ATP intracellulaire dans l'exocytose des CCI

Les CCI doivent être capables de soutenir indéfiniment des vitesses élevées d'exocytose, impliquant un recrutement de vésicules très efficace vers les zones actives. La diminution du niveau d'expression du senseur calcique otoferline chez les souris *Pachanga*, a montré que l'otoferline serait impliquée dans le recrutement vésiculaire dans les CCI (Pangrisc *et al.*, 2010). Très récemment, il a été montré que le remplacement de l'ATP intracellulaire par son homologue non hydrolysable, l'ATP $\gamma$ S, diminue les capacités des cellules ciliées de la grenouille à soutenir une exocytose pendant des dépolarisations de longues durées (Leal and von Gersdorff, 2014). Ces résultats suggèrent que le recrutement vésiculaire au niveau des cellules ciliées fait intervenir un mécanisme actif dépendant de l'ATP. Au contraire, le recrutement vésiculaire dans les cellules bipolaires ne dépendrait pas de l'ATP (Heidelberger *et al.*, 2002). Dans ces cellules bipolaires, l'ATP n'interviendrait qu'au niveau des étapes finales de l'exocytose.

Dans nos expériences récentes (non incluses dans nos articles), nous montrons que l'ATP $\gamma$ S ne bloque pas l'exocytose mais en réduit significativement la vitesse initiale (**Fig. 33A**). Ce résultat suggère qu'au moins une des étapes de l'exocytose des CCI est dépendante de l'hydrolyse de l'ATP

Par ailleurs, nous avons étudié l'implication possible d'un moteur dépendant de l'ATP, telle que la kinésine. Ce moteur est bien connu comme essentiel dans le transport actif des vésicules synaptiques le long des microtubules vers la synapse des neurones (voir revue: Hirokawa *et al.*, 2009). Il est à noter que les CCI présentent un réseau de microtubules pouvant être le support du trafic vésiculaire vers leurs zones synaptiques (Steyger *et al.*, 1989; Furness *et al.*, 1990, Cho and von Gersdorff, 2011). Nos résultats montrent que l'application intracellulaire d'un inhibiteur spécifique de la kinésine, le monastrol (Cochran *et al.*, 2005) n'a pas d'effet sur l'exocytose des CCI (**Fig. 33B**). La myosine VI est aussi un candidat moteur possible du recrutement vésiculaire (Roux *et al.*, 2009). Le rôle de la myosine VI pourrait passer par son interaction avec l'otoferline (Heidrych *et al.*, 2009).

L'ensemble de ces résultats suggère la présence à la fois de mécanismes ATP dépendants et indépendants dans le contrôle des étapes de l'exocytose des CCI en accord avec l'étude de Ruth Heidelberger et ses collègues dans les cellules bipolaires de la rétine (2002).



### Figure 33: Rôle de l'ATP et de la kinésine dans l'exocytose des CCI

(Résultats non inclus dans mes articles)

(A) CCI dialysées avec une solution intracellulaire contenant de l' $ATP_{\gamma S}$  (1 mM; ATP non hydrolysable) (B) CCI dialysées avec une solution intracellulaire contenant du monastrol (50  $\mu M$ , bloqueur de la kinésine.). En A et B, l'exocytose est évoquée par la libération de  $Ca^{2+}$  encagé (DM nitrophène, 10 mM). En présence d' $ATP_{\gamma S}$  (A, Tracé turquoise), l'exocytose est préservée mais sa vitesse instantanée est largement ralentie comparé à celle du témoin ( $2,0 \pm 1,0$  pF/s et  $12,8 \pm 2,1$  pF/s;  $p < 0,05$ ). La vitesse instantanée de l'exocytose en présence de monastrol (B, tracé rose) ne montre pas de différence significative comparé à la condition témoin ( $12,5 \pm 4,4$  pF/s et  $12,8 \pm 2,1$  pF/s;  $p = 0,8$ ). Les vitesses ont été obtenues par la dérivée en chaque point de la courbe (non montrée).



## 8. La clarine 1 et l'organisation des canaux calciques Cav1.3

Les protéines Usher sont une classe de protéines impliquées essentiellement dans l'organisation et le maintien des stéréocils des cellules sensorielles de la cochlée et du vestibule, mais aussi dans le maintien de l'intégrité des photorécepteurs de la rétine (Grati and Kachar, 2011, Liu *et al.*, 2007; voir revue: Schawander *et al.*, 2010). Elles sont aussi impliquées dans la régulation de l'adaptation lente du courant de mécano-transduction. De manière générale, les mutations touchant ce type de protéines sont à l'origine du syndrome d'Usher caractérisé par une surdité et une cécité progressive parfois accompagnées de troubles de l'équilibre selon la sévérité de la maladie (Liu *et al.*, 1997; Kremer *et al.*, 2006). En effet l'absence d'une de ces protéines est à l'origine de la désorganisation complète des stéréocils bloquant la mécano-transduction (Self *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2007, Grillet *et al.*, 2009).

La clarine 1 (protéine USH3A) est une petite protéine de 4 segments transmembranaires dont la structure est très proche de la stargazine (Adatto *et al.*, 2002). Cette protéine est retrouvée dans les membranes pré- et post-synaptiques. Notre étude montre que la délétion spécifique de la clarine 1 dans les cellules ciliées produit une désorganisation des canaux Cav1.3 aux zones actives.

D'autres protéines Usher sont aussi possiblement impliquées à la synapse telles que l'harmonine (Gregory *et al.*, 2011), la whirline (Kersten *et al.*, 2010). La myosine VIIa (protéine USH1B) qui est exprimée par les cellules sensorielles de la cochlée a aussi été retrouvée dans la zone synaptique des photorécepteurs (Hasson *et al.*, 1995; El-Amraoui *et al.*, 1996; Grati and Kachar, 2011) suggérant un rôle de cette protéine dans l'organisation de la machinerie pré-synaptique des cellules sensorielles auditives et visuelles.

De nombreuses protéines d'Usher possèdent plusieurs domaines PDZ impliqués dans les interactions protéine-protéines, leur permettant de former des complexes protéiques. Nos expériences de co-immunoprecipitation suggèrent que la clarine 1, par l'intermédiaire de la sous-unité  $\beta 2$  forme un complexe avec la sous-unité  $\alpha 1D$  du canal calcique. La fonction des protéines d'Usher passe par leur capacité à former un réseau complexe avec le cytosquelette d'actine (voir revue: Schawander *et al.*, 2010). C'est notamment le cas de la whirline qui se lie à l'actine par l'intermédiaire de l'espine, une protéine associée à l'actine (Wang *et al.*, 2012) et même la clarine 1 (Tian *et al.*, 2009). Dans notre étude, nous montrons que ce cytosquelette d'actine synaptique est désorganisé dans les CCI de souris déficientes en clarine 1. Nos résultats suggèrent que l'actine-F et les protéines d'Usher sont essentielles non seulement à l'organisation fonctionnelle des stéréocils mais aussi à celle des synapses à ruban.

## 9. La clarine 1: maintien des fibres afférentes post-synaptiques

De nombreuses protéines ont été montrées comme essentielles à l'arrimage correct des membranes pré- et post-synaptique. Il s'agit notamment des protéines post-synaptiques contenant des motifs riches en leucine, interagissant au niveau pré-synaptique avec les neurexines ou les letrines (de Wit *et al.*, 2011).

En fonction de leur nature, cônes ou bâtonnets, les photorécepteurs font synapses avec différents types de cellules bipolaires. Les bâtonnets en particulier expriment la protéine ELFN-1, une fibronectine (molécule d'adhésion) capable de recruter et fixer les récepteurs glutamatergiques mGluR6, exprimés dans la membrane des cellules bipolaires, pendant la synaptogenèse. Il a été montré que l'expression du canal Cav1.4 est nécessaire pour l'expression et la localisation correcte de la protéine ELFN-1. En effet, l'absence du canal Cav1.4 entraîne une désorganisation complète des synapses entre les bâtonnets et les cellules bipolaires (Cao *et al.*, 2015).

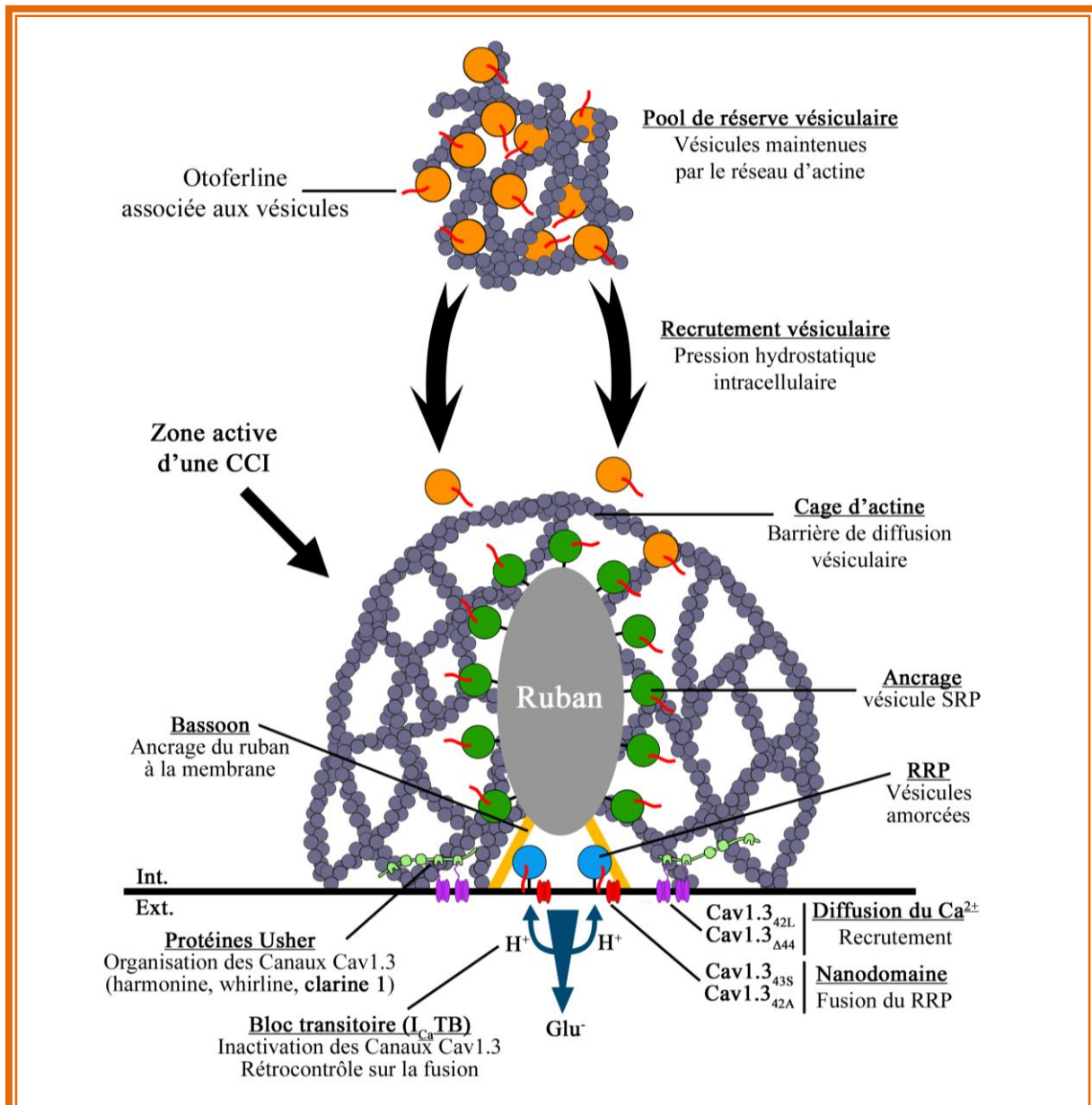
Notre étude sur la clarine 1 montre une désorganisation des récepteurs AMPA post-synaptiques mais aussi une dégénérescence des fibres afférentes. Ces résultats suggèrent que cette protéine Usher pourrait jouer un rôle équivalent à la stargazine (Adato *et al.*, 2002) pour l'organisation des récepteurs AMPA. La clarine 1, interagissant avec le complexe Cav1.3 pré-synaptique, pourrait participer à la formation de liens protéiques extracellulaires entre les membranes pré- et post-synaptiques.

## Conclusions sur l'organisation des zones actives des cellules ciliées

Les travaux de ma thèse ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'exocytose à l'origine des propriétés remarquables des synapses à ruban des cellules ciliées: une précision temporelle à la ms et une capacité à soutenir des vitesses très élevées (« phase locking » jusqu'au kHz), une grande sensibilité pour répondre à des variations du voltage de quelques mV, et enfin son infatigabilité. **Mes résultats montrent que:**

- La sensibilité calcique de l'exocytose otoferline-dépendante présente un  $K_d$  de 4  $\mu$ M environ. Ce  $K_d$  a une valeur vingt fois inférieure à celui de l'exocytose contrôlée par les synaptotagmines I et II des synapses neuronales "à potentiels d'actions". Cette grande sensibilité calcique permet aux cellules ciliées de moduler leur vitesse d'exocytose pour des potentiels récepteurs très faibles (seulement quelques mV).
- Les CCI expriment des isoformes courtes (Cav1.3<sub>43S</sub> et Cav1.3<sub>42A</sub>) et longues (Cav1.3<sub>42L</sub> et Cav1.3<sub>44</sub>) du canal calcique Cav1.3, organisées de manière spécifique sous le ruban synaptique.
- L'inactivation rapide des isoformes courtes du canal Cav1.3 est régulée à la fois par le  $Ca^{2+}$  intracellulaire et par les protons sécrétés lors de la fusion.
- L'organisation spatiale de ces différentes isoformes est régulée par les protéines Usher (clarine 1, harmonine) et le cytosquelette d'actine.
- Autour de chaque zone active, le cytosquelette d'actine forme un réseau en cage régulant la diffusion des vésicules autour des rubans.

Le schéma de la figure 34 résume l'ensemble de mes hypothèses.



**Figure 34: Schéma récapitulatif de l'organisation d'une zone active de cellule ciliée interne** Les canaux calciques Cav1.3 ont une double distribution. Les isoformes courtes Cav1.3<sub>43S</sub> et Cav1.3<sub>42A</sub> (canaux calciques rouges) contrôlent la fusion rapide des vésicules du RRP (vésicules bleues). Les isoformes longues Cav1.3<sub>42L</sub> et Cav1.3<sub>Δ44</sub> (canaux calciques violets) sont organisées en microdomaine autour du ruban et permettraient une diffusion intracellulaire plus lointaine des ions  $Ca^{2+}$ . Cette diffusion serait importante pour le recrutement de vésicules lointaines (vésicules orange). L'ancrage de ces vésicules au ruban permet de reformer le SRP (vésicules vertes). Les isoformes courtes Cav1.3<sub>43S</sub> et Cav1.3<sub>42A</sub> présentent aussi une double régulation: 1) en intracellulaire par l'inactivation dépendante du  $Ca^{2+}$ , 2) en extracellulaire par la libération de  $H^+$  lors de l'exocytose. Chaque zone active, est associée à une cage d'actine-F permettant de réguler le flux vésiculaire jusqu'aux sites de fusion. Les protéines Usher, associées à l'actine-F, forment un complexe protéique avec la sous-unité  $\beta 2$  du canal calcique Cav1.3 pour réguler la distribution des canaux Cav1.3 dans les zones actives. Il est à noter que nous ne savons pas encore si les protéines Usher régulent de manière identique l'organisation des isoformes courtes et longues du canal calcique Cav1.3.

# Perspectives

Notre étude expérimentale de la synapse à ruban des CCIIs s'est principalement focalisée sur les mécanismes de l'exocytose pré-synaptique. Une approche post-synaptique par des enregistrements directs sur les boutons des fibres afférentes du nerf auditif est maintenant nécessaire pour affiner nos hypothèses. Des enregistrements des courants excitateurs post-synaptiques sur ces boutons n'ont été effectués à ce jour que sur des souris très jeunes (*i.e.* organe auditif non mature; Goutman and Glowatzki, 2007).

J'ai en projet d'aller comme post-doc dans le laboratoire d'Elisabeth Glowatzki à l'université John Hopkins (Baltimore, USA) afin de confirmer ces résultats au niveau post-synaptique sur des CCIIs de souris adultes.

Une autre voie de recherche que j'aimerais entreprendre par la suite serait de comprendre comment l'otoferline est capable d'agir comme un senseur calcique à la fois pour la fusion et pour le recrutement vésiculaire. Etant donné la taille importante de l'otoferline (1999 acides aminés), on peut imaginer que celle-ci puissent subir certaines modifications post-traductionnelles comme des clivages protéolytiques à l'image de la dysferline. En effet, la dysferline, une protéine de la famille des ferlines proche de l'otoferline, peut subir un clivage par les calpaïnes pour pouvoir réparer les membranaires des cellules musculaires (Lek *et al.*, 2013).

Existe-t-il un tel mécanisme de régulation protéolytique pour l'otoferline dans les CCIIs?

La partie C-terminale de la sous unité  $\alpha 1D$  peut jouer le rôle de facteur de transcription lorsque celle-ci est clivée. Elle permettrait de réguler l'expression du canal potassique dépendant du  $Ca^{2+}$  (SK2) dans les cardiomyocytes (Lu *et al.*, 2015). Le clivage par les calpaïnes apparaît comme un processus touchant l'ensemble des ferlines (myoferline, dysferline et otoferline; Redpath *et al.*, 2014). Cependant le clivage de l'otoferline par cette protéase n'a été démontré que dans le cas de la ré-expression *in vitro* de l'otoferline dans les cellules HEK. J'envisage donc d'explorer si l'otoferline est aussi clivée dans les cellules sensorielles. La protéolyse de l'otoferline pourrait ainsi générer des facteurs de transcription et/ou des formes tronquées ayant un rôle spécifique dans le cycle de l'exocytose vésiculaire.

Notre étude a montré l'expression de différentes isoformes du canal Cav1.3 dans les CCIIs, (Cav1.3<sub>43S</sub>, Cav1.3<sub>42A</sub>, Cav1.3<sub>42L</sub> et Cav1.3<sub>Δ44</sub>). Pour préciser le rôle spécifique de chacune de ces isoformes, j'envisage d'éteindre *in vivo*, chez la souris, l'expression de chacune de ces isoformes (par des techniques d'injection intra-cochléaire d'AAV produisant des ARNs interférents). Des anticorps spécifiques pour chacune de ces isoformes pourront être générés pour visualiser en microscopie confocale haute résolution leur distribution et leur dynamique dans les zones actives des CCIIs.

# **Références Bibliographiques**

1. Achanzar WE, Ward S (1997) A nematode gene required for sperm vesicle fusion. *J Cell Sci* 110:1073-1081.
2. Adato A, Vreugde S, Joensuu T, Avidan N, Hamalainen R, Belenkiy O, Olender T, Bonne-Tamir B, Ben-Asher E, Espinos C, Millan JM, Lehesjoki AE, Flannery JG, Avraham KB, Pietrokovski S, Sankila EM, Beckmann JS, Lancet D (2002) USH3A transcripts encode clarin-1, a four-transmembrane-domain protein with a possible role in sensory synapses. *Eur J Hum Genet* 10:339-350.
3. An MT, Zamponi W (2000) Voltage-Dependent Inactivation of Voltage Gated Calcium Channels. Chapter from the book *Madame Curie Bioscience Database*.
4. Ashery U, Varoqueaux F, Voets T, Betz A, Thakur P, Koch H, Neher E, Brose N, Rettig J (2000) Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J* 19:3586-3596.
5. Akil O, Seal RP, Burke K, Wang C, Alemi A, During M, Edwards RH, Lustig LR (2012) Restoration of hearing in the VGLUT3 knockout mouse using virally mediated gene therapy. *Neuron* 75:283-293.
6. Ashmore J (2008) Cochlear outer hair cell motility. *Physiol Rev* 88:173-210.
7. Arikath J, Campbell KP (2003) Auxiliary subunits: Essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 13: 298–307.
8. Ball SL, Powers PA, Shin HS, Morgans CW, Peachey NS, Gregg RG (2002) Role of the beta (2) subunit of voltage-dependent calcium channels in the retinal outer plexiform layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:1595-1603.
9. Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R, McNeil PL, Campbell KP (2003) Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 423:168-172.
10. Bao H, Wong WH, Goldberg JM, Eatock RA (2003) Voltage-gated calcium channel currents in type I and type II hair cells isolated from the rat crista. *Journal of Neurophysiology* 90:155-164.
11. Ben Johny M, Yang PS, Bazzazi H, Yue DT (2013) Dynamic switching of calmodulin interactions underlies Ca<sup>2+</sup> regulation of CaV1.3 channels. *Nat Commun* 4:1717.
12. Bennett MK, Calakos N, Scheller RH (1992) Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257:255-259.
13. Berntson AK, Morgans CW (2003) Distribution of the presynaptic calcium sensors, synaptotagmin I/II and synaptotagmin III, in the goldfish and rodent retinas. *J Vis* 3:274-280.
14. Beurg M, Safieddine S, Roux I, Bouleau Y, Petit C, Dulon D (2008) Calcium- and otoferlin-dependent exocytosis by immature outer hair cells. *J Neurosci* 28:1798-1803.



15. 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.
16. Beurg M, Michalski N, Safieddine S, Bouleau Y, Schneggenburger R, Chapman ER, Petit C, Dulon D (2010) Control of Exocytosis by Synaptotagmins and Otoferlin in Auditory Hair Cells. *J Neurosci* 30:13281-13290.
17. Beurg M, Xiong W, Zhao B, Muller U, Fettiplace R (2015) Subunit determination of the conductance of hair-cell mechanotransducer channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:1589-1594.
18. Beutner D, Voets T, Neher E, Moser T (2001) Calcium dependence of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse. *Neuron* 29:681-690.
19. Beyenbach KW, Wieczorek H (2006) The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol* 209:577-589.
20. Blasi J, Chapman ER, Yamasaki S, Binz T, Niemann H, Jahn R (1993) Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J* 12:4821-4828.
21. Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, De Camilli P, Sudhof TC, Niemann H, Jahn R (1993) Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 365:160-163.
22. Bock G, Gebhart M, Scharinger A, Jangsangthong W, Busquet P, Poggiani C, Sartori S, Mangoni ME, Sinnegger-Brauns MJ, Herzig S, Striessnig J, Koschak A (2011) Functional properties of a newly identified C-terminal splice variant of Cav1.3 L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 286, 42736-42748.
23. Bonsacquet J, Brugeaud A, Compan V, Desmadryl G, Chabbert C (2006) AMPA type glutamate receptor mediates neurotransmission at turtle vestibular calyx synapse. *J Physiol* 576:63-71.
24. Brandt A, Striessnig J, Moser T (2003) Ca(V)1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 23:10832-10840.
25. Brandt A, Khimich D, Moser T (2005) Few Ca(V)1.3 channels regulate the exocytosis of a synaptic vesicle at the hair cell ribbon synapse. *J Neurosci* 25:11577-11585.
26. Brichta AM, Aubert A, Eatock RA, Goldberg JM (2002) Regional analysis of whole cell currents from hair cells of the turtle posterior crista. *Journal of Neurophysiology* 88:3259-3278.
27. Brown AM, Kunze DL, Yatani A (1984) The agonist effect of dihydropyridines on Ca-channels. *Nature* 311:570-572.
28. Brown JT, Weatherall KL, Corria LR, Chater TE, Isaac JT, Marrion NV (2010) Vesicular release of glutamate utilizes the proton gradient between the vesicle and synaptic cleft. *Front Synaptic Neurosci* 2:15.

29. Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, de Ribaupierre Y (1985) Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 227:194-196.
30. Bucurenciu I, Kulik A, Schwaller B, Frotscher M, Jonas P (2008) Nanodomain coupling between Ca<sup>2+</sup> channels and Ca<sup>2+</sup> sensors promotes fast and efficient transmitter release at a cortical GABAergic synapse. *Neuron* 57:536-545.
31. Budde T, Meuth S, Pape HC (2002) Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nat Rev Neurosci* 3:873-883.
32. Bulankina AV, Moser T (2012) Neural circuit development in the mammalian cochlea. *Physiology (Bethesda)* 27:100-112.
33. Burgess DE, Crawford O, Delisle BP, Satin J (2002) Mechanism of inactivation gating of human T-type (low-voltage activated) calcium channels. *Biophys J* 82:1894-1906.
34. Cao Y, Sarria I, Fehlhaver KE, Kamasawa N, Orlandi C, James KN, Hazen JL, Gardner MR, Farzan M, Lee A, Baker S, Baldwin K, Sampath AP, Martemyanov KA (2015) Mechanism for Selective Synaptic Wiring of Rod Photoreceptors into the Retinal Circuitry and Its Role in Vision. *Neuron* 87:1248-1260.
35. Cain SM, Snutch TP (2010) Contributions of T-type calcium channel isoforms to neuronal firing Channels (Austin) 4:475-482.
36. Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a003947.
37. Chabbert C, Chambard JM, Sans A, Desmadryl G (2001) Three types of depolarization-activated potassium currents in acutely isolated mouse vestibular neurons. *J Neurophysiol* 85:1017-1026.
38. Chapochnikov NM, Takago H, Huang CH, Pangrsic T, Khimich D, Neef J, Auge E, Gottfert F, Hell SW, Wichmann C, Wolf F, Moser T (2014) Uniquantal release through a dynamic fusion pore is a candidate mechanism of hair cell exocytosis. *Neuron* 83:1389-1403.
39. Chen Z, Das B, Nakamura Y, DiGregorio DA, Young SM, Jr. (2015) Ca<sup>2+</sup> channel to synaptic vesicle distance accounts for the readily releasable pool kinetics at a functionally mature auditory synapse. *J Neurosci* 35:2083-2100.
40. Chapman ER (2002) Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:498-508.
41. Chatterjee P, Padmanarayana M, Abdullah N, Holman CL, LaDu J, Tanguay RL, Johnson CP (2015) Otoferlin deficiency in zebrafish results in defects in balance and hearing: rescue of the balance and hearing phenotype with full-length and truncated forms of mouse otoferlin. *Mol Cell Biol* 35:1043-1054.
42. Chaudhry FA, Edwards RH, Fonnum F (2008) Vesicular neurotransmitter transporters as targets for endogenous and exogenous toxic substances. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:277-301.

43. Cho S, Li GL, von Gersdorff H (2011) Recovery from short-term depression and facilitation is ultrafast and Ca<sup>2+</sup> dependent at auditory hair cell synapses. *J Neurosci* 31:5682-5692.
44. Cho S, von Gersdorff H (2014) Proton-mediated block of Ca<sup>2+</sup> channels during multivesicular release regulates short-term plasticity at an auditory hair cell synapse. *J Neurosci* 34:15877-15887.
45. Chowdhury HH, Popoff MR, Zorec R (1999) Actin cytoskeleton depolymerization with clostridium spiroforme toxin enhances the secretory activity of rat melanotrophs. *J Physiol* 521 Pt 2:389-395.
46. Cingolani LA, Goda Y (2008) Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci* 9:344-356.
47. Cochran JC, Gatial JE, 3rd, Kapoor TM, Gilbert SP (2005) Monastrol inhibition of the mitotic kinesin Eg5. *J Biol Chem* 280:12658-12667.
48. Corwin JT, Cotanche DA (1988) Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science* 240:1772-1774.
49. Coussens L, Parker PJ, Rhee L, Yang-Feng TL, Chen E, Waterfield MD, Francke U, Ullrich A (1986) Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* 233:859-866.
50. Cristobal R, Lopez I, Chiang S, Honrubia D, Zamora C, Espinosa de los Monteros A, Micevych P, Honrubia V (1998) Hair cell formation in cultures of dissociated cells from the vestibular sensory epithelium of the bullfrog. *Am J Otol* 19:660-668.
51. Cristofanilli M, Mizuno F, Akopian A (2007) Disruption of actin cytoskeleton causes internalization of Ca(v)1.3 (alpha 1D) L-type calcium channels in salamander retinal neurons. *Mol Vis* 13:1496-1507.
52. Cui G, Meyer AC, Calin-Jageman I, Neef J, Haeseleer F, Moser T, Lee A (2007) Ca<sup>2+</sup>-binding proteins tune Ca<sup>2+</sup>-feedback to Cav1.3 channels in mouse auditory hair cells. *J Physiol* 585: 791-803.
53. Curtis BM, Catterall WA (1984) Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 23:2113-2118.
54. Dallos P (1992) The active cochlea. *J Neurosci* 12:4575-4585.
55. Davies A, Hendrich J, Van Minh AT, Wratten J, Douglas L, Dolphin AC (2007) Functional biology of the  $\alpha_2\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol Sci* 28: 220–228.
56. Davies A, Kadurin I, Alvarez-Laviada A, Douglas L, Nieto-Rostro M, Bauer CS, Pratt WS, Dolphin AC (2010) The  $\alpha_2\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proc Natl Acad Sci* 107: 1654–1659.

57. De Sevilla Muller LP, Liu J, Solomon A, Rodriguez A, Brecha NC (2013) Expression of voltage-gated calcium channel alpha(2)delta(4) subunits in the mouse and rat retina. *J Comp Neurol* 521:2486-2501.
58. DeVries SH (2001) Exocytosed protons feedback to suppress the Ca<sup>2+</sup> current in mammalian cone photoreceptors. *Neuron* 32:1107-1117.
59. de Wit J, Hong W, Luo L, Ghosh A (2011) Role of leucine-rich repeat proteins in the development and function of neural circuits. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:697-729.
60. Dhara M, Yarzagaray A, Schwarz Y, Dutta S, Grabner C, Moghadam PK, Bost A, Schirra C, Rettig J, Reim K, Brose N, Mohrmann R, Bruns D (2014) Complexin synchronizes primed vesicle exocytosis and regulates fusion pore dynamics. *J Cell Biol* 204:1123-1140.
61. Dick O, tom Dieck S, Altmann WD, Ammermuller J, Weiler R, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstatter JH (2003) The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina. *Neuron* 37:775-786.
62. Dolphin AC (2013) The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochim Biophys Acta* 1828:1541-1549.
63. Dong XX, Wang Y, Qin ZH (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* 30:379-387.
64. Dou HV, Vazquez AE, Namkung Y, Chu H, Cardell EL, Nie LP, Parson S, Shin H, Yamoah EN (2004) Null mutation of alpha(1D) Ca<sup>2+</sup> channel gene results in deafness but no vestibular defect in mice. *J Assoc for Res Otolaryngol* 5:215-226.
65. Dulon D, Safieddine S, Jones SM, Petit C (2009) Otoferlin Is Critical for a Highly Sensitive and Linear Calcium-Dependent Exocytosis at Vestibular Hair Cell Ribbon Synapses. *J Neurosci* 29:10474-10487.
66. Dulon D, Luo L, Zhang C, Ryan AF (1998) Expression of small-conductance calcium-activated potassium channels (SK) in outer hair cells of the rat cochlea. *Eur J Neurosci* 10:907-915.
67. Dulon D, Lenoir M (1996) Cholinergic responses in developing outer hair cells of the rat cochlea. *Eur J Neurosci* 8:1945-1952.
68. Duncker S.V, 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.
69. Eatock RA, Songer JE (2011) Vestibular Hair Cells and Afferents: Two Channels for Head Motion Signals. *Annu Rev Neurosci* 34:501-534.

70. Eggermann E, Bucurenciu I, Goswami SP, Jonas P (2012) Nanodomain coupling between Ca<sup>2+</sup>(+) channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nat Rev Neurosci* 13:7-21.
71. Ehre C, Rossi AH, Abdullah LH, De Pestel K, Hill S, Olsen JC, Davis CW (2005) Barrier role of actin filaments in regulated mucin secretion from airway goblet cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C46-56.
72. El-Amraoui A, Sahly I, Picaud S, Sahel J, Abitbol M, Petit C (1996) Human Usher 1B/mouse shaker-1: the retinal phenotype discrepancy explained by the presence/absence of myosin VIIA in the photoreceptor cells. *Hum Mol Genet* 5:1171-1178.
73. Elezgarai I, Puente N, Azkue JJ, Hermida D, Bilbao A, Diez J, Donate-Oliver F, Flores A, Grandes P (2003) Immunocytochemical distribution of the AMPA receptor subunits GluR2/3 and GluR4 in the cristae ampullares of the hatched chicken. *Eur J Anat* 2:79-83.
74. Engstrom H (1958) On the double innervation of the sensory epithelia of the inner ear. *Acta Otolaryngol* 49:109-118.
75. Erickson MG, Liang H, Mori MX, Yue DT (2003) FRET two-hybrid mapping reveals function and location of L-type Ca<sup>2+</sup> channel CaM preassociation. *Neuron* 39: 97-107.
76. Favre D, Sans A (1979) Morphological-changes in afferent vestibular hair cell synapses during the postnatal-development of the cat. *J Neurocytol* 8:765-775.
77. Fell B, Obermair GJ, Hecker D, Jung M, Münkner S, Schick B, Engel J (2014) The Ca<sup>2+</sup> Channel Subunit A2δ2 regulates Ca<sup>2+</sup> Channel Abundance and Function in Mouse Inner Hair Cells and is Required for Normal Hearing. 37<sup>th</sup> ARO meeting.
78. Ferguson SM, De Camilli P (2012) Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:75-88.
79. Fettiplace R, Hackney CM (2006) The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nat Rev Neurosci* 7:19-29.
80. Fox MA, Sanes JR (2007) Synaptotagmin I and II are present in distinct subsets of central synapses. *J Comp Neurol* 503:280-296.
81. Frank T, Khimich D, Neef A, Moser T (2009) Mechanisms contributing to synaptic Ca<sup>2+</sup> signals and their heterogeneity in hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4483-4488.
82. Frank T, Rutherford MA, Strenzke N, Neef A, Pangrsic T, Khimich D, Fejtova A, Gundelfinger ED, Liberman MC, Harke B, Bryan KE, Lee A, Egner A, Riedel D, Moser T (2010) Bassoon and the synaptic ribbon organize Ca<sup>2+</sup> channels and vesicles to add release sites and promote refilling. *Neuron* 68:724-738.

83. Fremeau RT, Jr., Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH (2002) The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14488-14493.
84. Fried RC, Blaustein MP (1978) Retrieval and recycling of synaptic vesicle membrane in pinched-off nerve terminals (synaptosomes). *J Cell Biol* 78:685-700.
85. Fuchs P (2008) Why do hair cells have ribbons? Focus on "synaptic ribbon enables temporal precision of hair cell afferent synapse by increasing the number of readily releasable vesicles: a modeling study". *J Neurophysiol* 100:1695-1696.
86. Fuchs PA (2014) A 'calcium capacitor' shapes cholinergic inhibition of cochlear hair cells. *J Physiol* 592:3393-3401.
87. Fuchs PA, Lehar M, Hiel H (2014) Ultrastructure of cisternal synapses on outer hair cells of the mouse cochlea. *J Comp Neurol* 522:717-729.
88. Furness DN, Hackney CM, Steyger PS (1990) Organization of microtubules in cochlear hair cells. *J Electron Microscop Tech* 15:261-279.
89. Gauthier BR, Wollheim CB (2008) Synaptotagmins bind calcium to release insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E1279-1286.
90. Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, Sudhof TC (1994) Synaptotagmin I: a major Ca<sup>2+</sup> sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79:717-727.
91. Glowatzki E, Fuchs PA (2002) Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci* 5:147-154.
92. Gillespie PG, Muller U (2009) Mechanotransduction by hair cells: models, molecules, and mechanisms. *Cell* 139:33-44.
93. Goldberg JM (2000) Afferent diversity and the organization of central vestibular pathways. *Exp Brain Res* 130:277-297.
94. Goutman JD, Glowatzki E (2007) Time course and calcium dependence of transmitter release at a single ribbon synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16341-16346.
95. Goutman JD (2012) Transmitter release from cochlear hair cells is phase locked to cyclic stimuli of different intensities and frequencies. *J Neurosci* 32:17025-17035a.
96. Grabner CP, Gandini MA, Rehak R, Le Y, Zamponi GW, Schmitz F (2015) RIM1/2-Mediated Facilitation of Cav1.4 Channel Opening Is Required for Ca<sup>2+</sup>-Stimulated Release in Mouse Rod Photoreceptors. *J Neurosci* 35:13133-13147.
97. Grant L, Yi EY, Glowatzki E (2010) Two Modes of Release Shape the Postsynaptic Response at the Inner Hair Cell Ribbon Synapse. *Journal of Neuroscience* 30:4210-4220.

98. Grant L, Fuchs P (2008) Calcium- and calmodulin-dependent inactivation of calcium channels in inner hair cells of the rat cochlea. *J Neurophysiol* 99:2183-2193.
99. Grati M, Kachar B (2011) Myosin VIIa and sans localization at stereocilia upper tip-link density implicates these Usher syndrome proteins in mechanotransduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:11476-11481.
100. Graydon CW, Cho S, Li GL, Kachar B, von Gersdorff H (2011) Sharp Ca<sup>2+</sup>(+) nanodomains beneath the ribbon promote highly synchronous multivesicular release at hair cell synapses. *J Neurosci* 31:16637-16650.
101. Gregory FD, Bryan KE, Pangrsic T, Calin-Jageman IE, Moser T, Lee A (2011) Harmonin inhibits presynaptic Cav1.3 Ca<sup>2+</sup>(+) channels in mouse inner hair cells. *Nat Neurosci* 14:1109-1111.
102. Griessmeier K, Cuny H, Rotzer K, Griesbeck O, Harz H, Biel M, Wahl-Schott C (2009) Calmodulin is a functional regulator of Cav1.4 L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 284:29809-29816.
103. Grillet N, Xiong W, Reynolds A, Kazmierczak P, Sato T, Lillo C, Dumont RA, Hintermann E, Sczaniecka A, Schwander M, Williams D, Kachar B, Gillespie PG, Muller U (2009) Harmonin mutations cause mechanotransduction defects in cochlear hair cells. *Neuron* 62:375-387.
104. Gurkoff G, Shahlaie K, Lyeth B, Berman R (2013) Voltage-gated calcium channel antagonists and traumatic brain injury. *Pharmaceuticals (Basel)* 6:788-812.
105. Haeseleer F, Imanishi Y, Maeda T, Possin DE, Maeda A, Lee A, Rieke F, Palczewski K (2004) Essential role of Ca<sup>2+</sup>-binding protein 4, a Cav1.4 channel regulator, in photoreceptor synaptic function. *Nat Neurosci* 7:1079-1087.
106. Hack I, Frech M, Dick O, Peichl L, Brandstatter JH (2001) Heterogeneous distribution of AMPA glutamate receptor subunits at the photoreceptor synapses of rodent retina. *Eur J Neurosci* 13:15-24.
107. Hackney CM, Mahendrasingam S, Penn A, Fettiplace R (2005) The concentrations of calcium buffering proteins in mammalian cochlear hair cells. *J Neurosci* 25(34):7867-75.
108. Hardie RC, Franze K. (2012). Photomechanical responses in *Drosophila* photoreceptors. *Science* 338:260-263.
109. Hashimoto S, Kimura RS (1988) Computer-aided three-dimensional reconstruction and morphometry of the outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol* 105:64-74.
110. Hasson T, Heintzelman MB, Santos-Sacchi J, Corey DP, Mooseker MS (1995) Expression in cochlea and retina of myosin VIIa, the gene product defective in Usher syndrome type 1B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9815-9819.
111. Heidelberger R, Sterling P, Matthews G (2002) Roles of ATP in depletion and replenishment of the releasable pool of synaptic vesicles. *J Neurophysiol* 88:98-106.



112. Heidrych P, Zimmermann U, Kuhn S, Frank C, Engel J, Duncker SV, Hirt B, Pusch CM, Ruth P, Pfister M, Marcotti W, Blin N, Knipper M (2009) Otoferlin interacts with myosin VI: implications for maintenance of the basolateral synaptic structure of the inner hair cell. *Hum Molec Genet* 13:2779-2790.
113. Hibino H, Pironkova R, Onwumere O, Vologodskaya M, Hudspeth AJ, Lesage F (2002) RIM binding proteins (RBPs) couple Rab3-interacting molecules (RIMs) to voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 34:411-423.
114. Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:682-696.
115. Holt M, Cooke A, Wu MM, Lagnado L (2003) Bulk membrane retrieval in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *J Neurosci* 23:1329-1339.
116. Holz RW, Brondyk H, Senter RA, Kuizon L, Macara IG (1994) Evidence for the involvement of Rab3A in Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis from adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* 269:10229-10234.
117. Housley GD, Ashmore JF (1992) Ionic currents of outer hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *J Physiol* 448:73-98.
118. Huang H, Yu D, Soong TW (2013) C-terminal alternative splicing of CaV1.3 channels distinctively modulates their dihydropyridine sensitivity. *Mol Pharmacol* 84: 643-653.
119. Hudson AW, Birnbaum MJ (1995) Identification of a nonneuronal isoform of synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5895-5899.
120. Huth ME, Ricci AJ, Cheng AG (2011) Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection. *Int J Otolaryngol* 2011:937861.
121. Inoue A, Obata K, Akagawa K (1992) Cloning and sequence analysis of cDNA for a neuronal cell membrane antigen, HPC-1. *J Biol Chem* 267:10613-10619.
122. Issa NP, Hudspeth AJ (1996) The entry and clearance of Ca<sup>2+</sup> at individual presynaptic active zones of hair cells from the bullfrog's sacculus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9527-9532.
123. Jing Z, Rutherford MA, Takago H, Frank T, Fejtova A, Khimich D, Moser T, Strenzke N (2013) Disruption of the presynaptic cytomatrix protein bassoon degrades ribbon anchorage, multiquantal release, and sound encoding at the hair cell afferent synapse. *J Neurosci* 33:4456-4467.
124. Johannes L, Lledo PM, Roa M, Vincent JD, Henry JP, Darchen F (1994) The GTPase Rab3a negatively controls calcium-dependent exocytosis in neuroendocrine cells. *EMBO J* 13:2029-2037.
125. Johnson CP, Chapman ER (2010) Otoferlin is a calcium sensor that directly regulates SNARE-mediated membrane fusion. *Journal of Cell Biology* 191:187-197.

126. Johnson J, Tian N, Caywood MS, Reimer RJ, Edwards RH, Copenhagen DR (2003) Vesicular neurotransmitter transporter expression in developing postnatal rodent retina: GABA and glycine precede glutamate. *J Neurosci* 23:518-529.
127. Johnson J, Sherry DM, Liu X, Fremeau RT, Jr., Seal RP, Edwards RH, Copenhagen DR (2004) Vesicular glutamate transporter 3 expression identifies glutamatergic amacrine cells in the rodent retina. *J Comp Neurol* 477:386-398.
128. Johnson SL, Adelman JP, Marcotti W (2007) Genetic deletion of SK2 channels in mouse inner hair cells prevents the developmental linearization in the Ca<sup>2+</sup> dependence of exocytosis. *J Physiol* 583:631-646.
129. Johnson SL, Marcotti W, Kros CJ (2005) Increase in efficiency and reduction in Ca<sup>2+</sup> dependence of exocytosis during development of mouse inner hair cells. *Journal of Physiology-London* 563:177-191.
130. Johnson SL, Forge A, Knipper M, Munkner S, Marcotti W (2008) Tonotopic variation in the calcium dependence of neurotransmitter release and vesicle pool replenishment at mammalian auditory ribbon synapses. *J Neurosci* 28:7670-7678.
131. Johnson SL, Franz C, Kuhn S, Furness DN, Ruttiger L, Munkner S, Rivolta MN, Seward EP, Herschman HR, Engel J, Knipper M, Marcotti W (2010) Synaptotagmin IV determines the linear Ca<sup>2+</sup> dependence of vesicle fusion at auditory ribbon synapses. *Nat Neurosci* 13:45-52.
132. Johnson SL, Wedemeyer C, Vetter DE, Adachi R, Holley MC, Elgoyhen AB, Marcotti W (2013) Cholinergic efferent synaptic transmission regulates the maturation of auditory hair cell ribbon synapses. *Open Biol* 3:130163.
133. Johnson SL, Kuhn S, Franz C, Ingham N, Furness DN, Knipper M, Steel KP, Adelman JP, Holley MC, Marcotti W (2013) Presynaptic maturation in auditory hair cells requires a critical period of sensory-independent spiking activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:8720-8725.
134. Jorgensen JM (1991) Regeneration of lateral line and inner ear vestibular cells. *Ciba Found Symp* 160:151-163.
135. Jung S, Oshima-Takago T, Chakrabarti R, Wong AB, Jing Z, Yamanbaeva G, Picher MM, Wojcik SM, Gottfert F, Predoehl F, Michel K, Hell SW, Schoch S, Strenzke N, Wichmann C, Moser T (2015) Rab3-interacting molecules 2alpha and 2beta promote the abundance of voltage-gated Ca<sub>v</sub>1.3 Ca<sup>2+</sup> channels at hair cell active zones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E3141-3149.
136. Kachar B, Battaglia A, Fex J (1997) Compartmentalized vesicular traffic around the hair cell cuticular plate. *Hear Res* 107: 102-112.
137. Kaeser PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J, Sudhof TC (2011) RIM proteins tether Ca<sup>2+</sup> channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell* 144:282-295.

138. Kantardzhieva A, Peppi M, Lane WS, Sewell WF (2012) Protein composition of immunoprecipitated synaptic ribbons. *J Proteome Res* 11:1163-1174.
139. Kawashima Y, Geleoc GS, Kurima K, Labay V, Lelli A, Asai Y, Makishima T, Wu DK, Della Santina CC, Holt JR, Griffith AJ (2011) Mechanotransduction in mouse inner ear hair cells requires transmembrane channel-like genes. *J Clin Invest* 121:4796-4809.
140. Kersten FF, van Wijk E, van Reeuwijk J, van der Zwaag B, Marker T, Peters TA, Katsanis N, Wolfrum U, Keunen JE, Roepman R, Kremer H (2010) Association of whirlin with Cav1.3 (alpha1D) channels in photoreceptors, defining a novel member of the usher protein network. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:2338-2346.
141. Khanin R, Parnas H, Segel L (1997) A mechanism for discharge of charged excitatory neurotransmitter. *Biophys J* 72:507-521.
142. Khimich D, Nouvian R, Pujol R, Tom Dieck S, Egner A, Gundelfinger ED, Moser T (2005) Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature* 434:889-894.
143. Kiang NY (1965) Discharge patterns of single fibers in the cat's auditory nerve. Cambridge, Ma: MIT press.
144. Kim MH, Li GL, von Gersdorff H (2013) Single Ca<sup>2+</sup> channels and exocytosis at sensory synapses. *J Physiol* 591:3167-3178.
145. Knirsch M, Brandt N, Braig C, Kuhn S, Hirt B, Munkner S, Knipper M, Engel J (2007) Persistence of Ca(v)1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in mature outer hair cells supports outer hair cell afferent signaling. *J Neurosci* 27:6442-6451.
146. Kong JH, Adelman JP, Fuchs PA (2008) Expression of the SK2 calcium-activated potassium channel is required for cholinergic function in mouse cochlear hair cells. *J Physiol* 586:5471-5485.
147. Koschak A, Reimer D, Walter D, Hoda JC, Heinzle T, Grabner M, Striessnig J (2003) Cav1.4alpha1 subunits can form slowly inactivating dihydropyridine-sensitive L-type Ca<sup>2+</sup> channels lacking Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation. *J Neurosci* 23:6041-6049.
148. Krajacic P, Hermanowski J, Lozynska O, Khurana TS, Lamitina T (2009) C. elegans dysferlin homolog fer-1 is expressed in muscle, and fer-1 mutations initiate altered gene expression of muscle enriched genes. *Physiol Genomics* 40:8-14.
149. Kremer H, van Wijk E, Marker T, Wolfrum U, Roepman R (2006) Usher syndrome: molecular links of pathogenesis, proteins and pathways. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2:R262-270.
150. Kummel D, Krishnakumar SS, Radoff DT, Li F, Giraud CG, Pincet F, Rothman JE, Reinisch KM (2011) Complexin cross-links prefusion SNAREs into a zigzag array. *Nat Struct Mol Biol* 18:927-933.

151. Lacerda AE, Kim HS, Ruth P, Perez-Reyes E, Flockerzi V, Hofmann F, Birnbaumer L, Brown AM. (1991) Normalization of current kinetics by interaction between the  $\alpha 1$  and  $\beta$  subunits of the skeletal muscle dihydropyridinesensitive calcium channel. *Nature* 352: 527–530.
152. Leal K, von gersdorff E (2014) Involvement of ATP in Vesicle Pool Replenishment and Exocytosis in Auditory Hair Cell Synapse. 37<sup>th</sup> ARO meeting.
153. Lee S, Briklín O, Hiel H, Fuchs P (2007) Calcium-dependent inactivation of calcium channels in cochlear hair cells of the chicken. *J Physiol* 583: 909-922.
154. Lek A, Lek M, North KN, Cooper ST (2010) Phylogenetic analysis of ferlin genes reveals ancient eukaryotic origins. *BMC Evol Biol* 10:231.
155. Lek A, Evesson FJ, Lemckert FA, Redpath GM, Lueders AK, Turnbull L, Whitchurch CB, North KN, Cooper ST (2013) Calpains, cleaved mini-dysferlinC72, and L-type channels underpin calcium-dependent muscle membrane repair. *J Neurosci* 33:5085-5094.
156. Lenzi D, Runyeon JW, Crum J, Ellisman MH, Roberts WM (1999) Synaptic vesicle populations in saccular hair cells reconstructed by electron tomography. *J Neurosci* 19:119-132.
157. Levic S, Nie L, Tuteja D, Harvey M, Sokolowski BH, Yamoah EN (2007) Development and regeneration of hair cells share common functional features. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19108-19113.
158. Li A, Xue J, Peterson EH (2008) Architecture of the mouse utricle: macular organization and hair bundle heights. *J Neurophysiol* 99:718-733.
159. Liberman LD, Wang HB, Liberman MC (2011) Opposing Gradients of Ribbon Size and AMPA Receptor Expression Underlie Sensitivity Differences among Cochlear-Nerve/Hair-Cell Synapses. *Journal of Neuroscience* 31:801-808.
160. Liberman MC (1980a) Morphological differences among radial afferent fibers in the cat cochlea: an electron-microscopic study of serial sections. *Hear Res* 3:45-63.
161. Liberman MC (1982a) Single-neuron labeling in the cat auditory nerve. *Science* 216:1239-1241.
162. Liberman MC, Dodds LW, Pierce S (1990) Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 301:443-460.
163. Liberman MC, Gao J, He DZ, Wu X, Jia S, Zuo J (Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature* 419:300-304.2002).
164. Liberman MC, Liberman LD, Maison SF (2014) Efferent feedback slows cochlear aging. *J Neurosci* 34:4599-4607.

165. Link E, Edelmann L, Chou JH, Binz T, Yamasaki S, Eisel U, Baumert M, Sudhof TC, Niemann H, Jahn R (1992) Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 189:1017-1023.
166. Littleton JT, Stern M, Schulze K, Perin M, Bellen HJ (1993) Mutational analysis of *Drosophila* synaptotagmin demonstrates its essential role in Ca<sup>2+</sup>-activated neurotransmitter release. *Cell* 74:1125-1134.
167. Liu X, Bulgakov OV, Darrow KN, Pawlyk B, Adamian M, Liberman MC, Li T (2007) Usherin is required for maintenance of retinal photoreceptors and normal development of cochlear hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4413-4418.
168. Liu X, Yang PS, Yang W, Yue DT (2010) Enzyme-inhibitor-like tuning of Ca<sup>2+</sup> channel connectivity with calmodulin. *Nature* 463: 968-972.
169. Liu X, Kerov V, Haeseleer F, Majumder A, Artemyev N, Baker SA, Lee A (2013) Dysregulation of Ca<sub>v</sub>1.4 channels disrupts the maturation of photoreceptor synaptic ribbons in congenital stationary night blindness type 2. *Channels (Austin)* 7:514-523.
170. Liu XZ, Newton VE, Steel KP, Brown SD (1997) Identification of a new mutation of the myosin VII head region in Usher syndrome type 1. *Hum Mutat* 10:168-170.
171. Lu L, Sirish P, Zhang Z, Woltz RL, Li N, Timofeyev V, Knowlton AA, Zhang XD, Yamoah EN, Chiamvimonvat N (2015) Regulation of gene transcription by voltage-gated L-type calcium channel, Cav1.3. *J Biol Chem* 290:4663-4676.
172. Lysakowski A, Goldberg JM (2008) Ultrastructural analysis of the cristae ampullares in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Journal of Comparative Neurology* 511:47-64.
173. Lysakowski A, Goldberg JM (1997) A regional ultrastructural analysis of the cellular and synaptic architecture in the chinchilla cristae ampullares. *J Comp Neurol* 389:419-443.
174. Lysakowski A, Gaboyard-Niay S, Calin-Jageman I, Chatlani S, Price SD, Eatock RA (2011) Molecular Microdomains in a Sensory Terminal, the Vestibular Calyx Ending. *Journal of Neuroscience* 31:10101-10114.
175. Malacombe M, Bader MF, Gasman S (2006) Exocytosis in neuroendocrine cells: new tasks for actin. *Biochim Biophys Acta* 1763:1175-1183.
176. Martinez O, Goud B (1998), Rab proteins. *Biochim Biophys Acta* 1404:101-112.
177. Martini M, Rossi ML, Rubbini G, Rispoli G (2000) Calcium currents in hair cells isolated from semicircular canals of the frog. *Biophys J* 78:1240-1254.
178. Matsubara A, Laake JH, Davanger S, Usami S, Ottersen OP (1996) Organization of AMPA receptor subunits at a glutamate synapse: a quantitative immunogold analysis of hair cell synapses in the rat organ of Corti. *J Neurosci* 16:4457-4467.
179. Matthews G, Fuchs P (2010) The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission. *Nat Rev Neurosci* 11:812-822.

180. McMahon HT, Missler M, Li C, Sudhof TC (1995) Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell* 83:111-119.
181. McMahon HT, Boucrot E (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:517-533.
182. Mercer AJ, Thoreson WB (2011) The dynamic architecture of photoreceptor ribbon synapses: cytoskeletal, extracellular matrix, and intramembrane proteins. *Vis Neurosci* 28:453-471.
183. Mercer AJ, Chen M, Thoreson WB (2001) Lateral mobility of presynaptic L-type calcium channels at photoreceptor ribbon synapses. *J Neurosci* 21:4397-4406.
184. Meyer AC, Frank T, Khimich D, Hoch G, Riedel D, Chapochnikov NM, Yarin YM, Harke B, Hell SW, Egnér A, Moser T (2009) Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. *Nat Neurosci* 12:444-453.
185. Michna M, Knirsch M, Hoda JC, Muenkner S, Langer P, Platzer J, Striessnig J, Engel J (2003) Cav1.3 ( $\alpha 1D$ )  $Ca^{2+}$  currents in neonatal outer hair cells of mice. *J Physiol* 553:747-758.
186. Morgans CW, Brandstatter JH, Kellerman J, Betz H, Wässle H (1996) A SNARE complex containing syntaxin 3 is present in ribbon synapses of the retina. *J Neurosci* 16:6713-6721.
187. Moser T, Predoehl F, Starr A (2013) Review of hair cell synapse defects in sensorineural hearing impairment. *Otol Neurotol* 34:995-1004.
188. Moser T, Beutner D (2000) Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:883-888.
189. Müller M, von Hunerbein K, Hoidis S, Smolders JW (2005) A physiological place-frequency map of the cochlea in the CBA/J mouse. *Hear Res* 202:63-73.
190. Naraghi M, Neher E (1997) Linearized buffered  $Ca^{2+}$  diffusion in microdomains and its implications for calculation of  $Ca^{2+}$  at the mouth of a calcium channel. *Journal of Neuroscience* 17:6961-6973.
191. Nawy S (1999) The metabotropic receptor mGluR6 may signal through  $G(o)$ , but not phosphodiesterase, in retinal bipolar cells. *J Neurosci* 19:2938-2944.1999).
192. Neef J, Gehrt A, Bulankina AV, Meyer AC, Riedel D, Gregg RG, Strenzke N, Moser T (2009) The  $Ca^{2+}$  channel subunit  $\beta 2$  regulates  $Ca^{2+}$  channel abundance and function in inner hair cells and is required for hearing. *J Neurosci* 29:10730-10740.
193. Neef J, Jung S, Wong AB, Reuter K, Pangrsic T, Chakrabarti R, Kugler S, Lenz C, Nouvian R, Boumil RM, Frankel WN, Wichmann C, Moser T (2014) Modes and regulation of endocytic membrane retrieval in mouse auditory hair cells. *J Neurosci* 34:705-716.

194. Nie L, Zhu J, Gratton MA, Liao A, Mu KJ, Nonner W, Richardson GP, Yamoah EN (2008) Molecular identity and functional properties of a novel T-type Ca<sup>2+</sup> channel cloned from the sensory epithelia of the mouse inner ear. *Journal of Neurophysiology* 100:2287-2299.
195. Nouvian R, Beutner D, Parsons TD, Moser T (2006) Structure and function of the hair cell ribbon synapse. *J Membr Biol* 209:153-165.
196. 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.
197. Obholzer N, Wolfson S, Trapani JG, Mo W, Nechiporuk A, Busch-Nentwich E, Seiler C, Sidi S, Sollner C, Duncan RN, Boehland A, Nicolson T (2008) Vesicular glutamate transporter 3 is required for synaptic transmission in zebrafish hair cells. *J Neurosci* 28:2110-2118.
198. Oyler GA, Higgins GA, Hart RA, Battenberg E, Billingsley M, Bloom FE, Wilson MC (1989) The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol* 109:3039-3052.
199. Palmer AR, Russell IJ (1986) Phase-locking in the cochlear nerve of the guinea-pig and its relation to the receptor potential of inner hair-cells. *Hearing Research* 24:1-15.
200. Palmer MJ, Hull C, Vigh J, von Gersdorff H (2003) Synaptic cleft acidification and modulation of short-term depression by exocytosed protons in retinal bipolar cells. *J Neurosci* 23:11332-11341.
201. 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-U116.
202. Pangrsic T, Gabrielaitis M, Michanski S, Schwaller B, Wolf F, Strenzke N, Moser T (2015) EF-hand protein Ca<sup>2+</sup> buffers regulate Ca<sup>2+</sup> influx and exocytosis in sensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E1028-1037.
203. Parsons TD, Sterling P (2003) Synaptic ribbon. Conveyor belt or safety belt? *Neuron* 37:379-382.
204. Patel SH, Salvi JD, Maoileidigh DO, Hudspeth AJ (2012) Frequency-Selective Exocytosis by Ribbon Synapses of Hair Cells in the Bullfrog's Amphibian Papilla. *Journal of Neuroscience* 32:13433-13438.
205. Pearse BM (1975) Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J Mol Biol* 97:93-98.
206. Pearse BM (1976) Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:1255-1259.



207. Perez-Reyes E, Kim HS, Lacerda AE, Horne W, Wei XY, Rampe D, Campbell KP, Brown AM, Birnbaumer L (1989) Induction of calcium currents by the expression of the  $\alpha 1$  subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature* 340: 233–236.
208. Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT (1999) Calmodulin is the  $\text{Ca}^{2+}$  sensor for  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22: 549-558.
209. Pirone A, Kurt S, Zuccotti A, Ruttiger L, Pilz P, Brown DH, Franz C, Schweizer M, Rust MB, Rubsam R, Friauf E, Knipper M, Engel J (2014)  $\alpha 2\delta 3$  is essential for normal structure and function of auditory nerve synapses and is a novel candidate for auditory processing disorders. *J Neurosci* 34:434-445.
210. Platt SR (2007) The role of glutamate in central nervous system health and disease--a review. *Vet J* 173:278-286.
211. 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  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Cell* 102:89-97.
212. Qin N, Olcese R, Bransby M, Lin T, Birnbaumer L (1999)  $\text{Ca}^{2+}$ -induced inhibition of the cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  channel depends on calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2435-2438.
213. Ramakrishnan NA, Drescher MJ, Drescher DG (2009) Direct interaction of otoferlin with syntaxin 1A, SNAP-25, and the L-type voltage-gated calcium channel Cav1.3. *J Biol Chem* 284:1364-1372.
214. Ramakrishnan NA, Drescher MJ, Morley BJ, Kelley PM, Drescher DG (2014) Calcium regulates molecular interactions of otoferlin with soluble NSF attachment protein receptor (SNARE) proteins required for hair cell exocytosis. *J Biol Chem* 289:8750-8766.
215. Rao-Mirotznik R, Harkins AB, Buchsbaum G, Sterling P (1995) Mammalian rod terminal: architecture of a binary synapse. *Neuron* 14:561-569.
216. Redpath GM, Woolger N, Piper AK, Lemckert FA, Lek A, Greer PA, North KN, Cooper ST (2014) Calpain cleavage within dysferlin exon 40a releases a synaptotagmin-like module for membrane repair. *Mol Biol Cell* 25:3037-3048.
217. Reim K, Wegmeyer H, Brandstatter JH, Xue M, Rosenmund C, Dresbach T, Hofmann K, Brose N (2005) Structurally and functionally unique complexins at retinal ribbon synapses. *J Cell Biol* 169:669-680.
218. Reim K, Regus-Leidig H, Ammermuller J, El-Kordi A, Radyushkin K, Ehrenreich H, Brandstatter JH, Brose N (2009) Aberrant function and structure of retinal ribbon synapses in the absence of complexin 3 and complexin 4. *J Cell Sci* 122:1352-1361.
219. Robertson, D (1984) HRP injection of physiologically characterized afferent and efferent neurons in the guinea pig spiral ganglion. *Hear Res* 15:113-121.

220. Robertson D, Sellick PM, Patuzzi R (1999) The continuing search for outer hair cell afferents in the guinea pig spiral ganglion. *Hear Res* 136:151-158.
221. Roberson DF, Weisleder P, Bohrer PS, Rubel EW (1992) Ongoing production of sensory cells in the vestibular epithelium of the chick. *Hear Res* 57:166-174.
222. Rosenmund C, Sigler A, Augustin I, Reim K, Brose N, Rhee JS (2002) Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms. *Neuron* 33:411-424.
223. Rothman JE (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372:55-63.
224. 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.
225. Roux I, Hosie S, Johnson SL, Bahloul A, Cayet N, Nouaille S, Kros CJ, Petit C, Safieddine S (2009) Myosin VI is required for the proper maturation and function of inner hair cell ribbon synapses. *Hum Mol Genet* 18:4615-4628.
226. Roux I, Wersinger E, McIntosh JM, Fuchs PA, Glowatzki E (2011) Onset of cholinergic efferent synaptic function in sensory hair cells of the rat cochlea. *J Neurosci* 31:15092-15101.
227. Rubel EW, Furrer SA, Stone JS (2013) A brief history of hair cell regeneration research and speculations on the future. *Hear Res* 297:42-51.
228. Rudolph S, Tsai MC, von Gersdorff H, Wadiche JI (2015) The ubiquitous nature of multivesicular release. *Trends Neurosci* 38:428-438.
229. Rusakov DA (2006) Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanisms of presynaptic control at central synapses. *Neuroscientist* 12:317-326.
230. Rusch A, Lysakowski A, Eatock RA (1998) Postnatal development of type I and type II hair cells in the mouse utricle: Acquisition of voltage-gated conductances and differentiated morphology. *Journal of Neuroscience* 18:7487-7501.
231. Rutherford MA (2015) Resolving the structure of inner ear ribbon synapses with STED microscopy. *Synapse* 69:242-255.
232. Sadeghi SG, Pyott SJ, Yu Z, Glowatzki E (2014) Glutamatergic signaling at the vestibular hair cell calyx synapse. *J Neurosci* 34:14536-14550.
233. Safieddine S, El-Amraoui A, Petit C (2012) The auditory hair cell ribbon synapse: from assembly to function. *Annu Rev Neurosci* 35:509-528.
234. Schaechinger TJ, Oliver D (2007) Nonmammalian orthologs of prestin (SLC26A5) are electrogenic divalent/chloride anion exchangers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7693-7698.

- 235.Scharinger A, Eckrich S, Vandael DH, Schonig K, Koschak A, Hecker D, Kaur G, Lee A, Sah A, Bartsch D, Benedetti B, Lieb A, Schick B, Singewald N, Sinnegger-Brauns MJ, Carbone E, Engel J, Striessnig J (2015) Cell-type-specific tuning of Cav1.3 Ca(2+)-channels by a C-terminal automodulatory domain. *Front Cell Neurosci* 9:309.
- 236.Schug N, Braig C, Zimmermann U, Engel J, Winter H, Ruth P, Blin N, Pfister M, Kalbacher H, Knipper M (2006) Differential expression of otoferlin in brain, vestibular system, immature and mature cochlea of the rat. *Eur J Neurosci* 24:3372-3380.
- 237.Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, Montecucco C (1992) Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359:832-835.
- 238.Schmitz F (2014) Presynaptic [Ca(2+)] and GCAPs: aspects on the structure and function of photoreceptor ribbon synapses. *Front Mol Neurosci* 7:3.
- 239.Schnee ME, Lawton DM, Furness DN, Benke TA, Ricci AJ (2005) Auditory hair cell-afferent fiber synapses are specialized to operate at their best frequencies. *Neuron* 47:243-254.
- 240.Schnee ME, Ricci AJ (2003) Biophysical and pharmacological characterization of voltage-gated calcium currents in turtle auditory hair cells. *J Physiol* 549:697-717.
- 241.Schwaller B, Meyer M, Schiffmann S (2002) 'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum* 1:241-258.
- 242.Schwander M, Kachar B, Muller U (2010) Review series: The cell biology of hearing. *J Cell Biol* 190:9-20.
- 243.Scimemi A, Diamond JS (2012) The number and organization of Ca<sup>2+</sup> channels in the active zone shapes neurotransmitter release from Schaffer collateral synapses. *J Neurosci* 32:18157-18176.
- 244.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.
- 245.Seiler C, Nicolson T (1999) Defective calmodulin-dependent rapid apical endocytosis in zebrafish sensory hair cell mutants. *J Neurobiol* 41: 424-434.
- 246.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.
- 247.Shaltiel L, Papparizos C, Fenske S, Hassan S, Gruner C, Rotzer K, Biel M, Wahl-Schott CA (2012) Complex regulation of voltage-dependent activation and inactivation properties of retinal voltage-gated Cav1.4 L-type Ca<sup>2+</sup> channels by Ca<sup>2+</sup>-binding protein 4 (CaBP4). *J Biol Chem* 287:36312-36321.

248. Sheets L, Hagen MW, Nicolson T (2014) Characterization of Ribeye subunits in zebrafish hair cells reveals that exogenous Ribeye B-domain and CtBP1 localize to the basal ends of synaptic ribbons. *Plos One* 9:e107256.
249. Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F, Dascal N (1991) The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* 253: 1553–1555.
250. Singer JH (2007) Multivesicular release and saturation of glutamatergic signalling at retinal ribbon synapses. *J Physiol* 580:23-29.
251. Singh A, Gebhart M, Fritsch R, Sinnegger-Brauns MJ, Poggiani C, Hoda JC, Engel J, Romanin C, Striessnig J, Koschak A (2008) Modulation of voltage- and Ca<sup>2+</sup>-dependent gating of CaV1.3 L-type calcium channels by alternative splicing of a C-terminal regulatory domain. *J Biol Chem* 283: 20733-20744.
252. Smith CA, Sjostrand FS (1961) Structure of the nerve endings on the external hair cells of the guinea pig cochlea as studied by serial sections. *J Ultrastruct Res* 5:523-556.
253. Song L, McGee J, Walsh EJ (2008) Development of cochlear amplification, frequency tuning, and two-tone suppression in the mouse. *J Neurophysiol* 99:344-355.
254. Strom TM, Nyakatura G, Apfelstedt-Sylla E, Hellebrand H, Lorenz B, Weber BH, Wutz K, Gutwillinger N, Ruther K, Drescher B, Sauer C, Zrenner E, Meitinger T, Rosenthal A, Meindl A (1998) An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 19:260-263.
255. Su ZL, Jiang SC, Gu R, Yang WP (1995) Two types of calcium channels in bullfrog saccular hair cells. *Hearing Res* 87:62-68.
256. Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395:347-353.
257. Sobkowicz HM, Rose JE, Scott GE, Slapnick SM (1982) Ribbon synapses in the developing intact and cultured organ of Corti in the mouse. *J Neurosci* 2:942-957.
258. Solsona C, Innocenti B, Fernandez JM (1998) Regulation of exocytotic fusion by cell inflation. *Biophys J* 74:1061-1073.
259. Songer JE, Eatock RA (2013) Tuning and Timing in Mammalian Type I Hair Cells and Caliceal Synapses. *Journal of Neuroscience* 33:3706-3724
260. Stewart MP, Toyoda Y, Hyman AA, Muller DJ (2011) Force probing cell shape changes to molecular resolution. *Trends Biochem Sci* 36:444-450.
261. 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.
262. Strenzke N, Chanda S, Kopp-Scheinflug C, Khimich D, Reim K, Bulankina AV, Neef A, Wolf F, Brose N, Xu-Friedman MA, Moser T (2009) Complexin-I is required for

- high-fidelity transmission at the endbulb of Held auditory synapse. *J Neurosci* 29:7991-8004.
263. Striessnig J, Pinggera A, Kaur G, Bock G, Tuluc P (2014) L-type Ca channels in heart and brain. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 3:15-38.
264. Sudhof TC (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375:645-653.
265. Sudhof TC (2002) Synaptotagmins: why so many? *J Biol Chem* 277:7629-7632.
266. Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509-547.
267. Sudhof TC (2013) A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nat Med* 19:1227-1231.
268. Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BF, Catterall WA (1987) Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci* 84: 5478–5482.
269. Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R (2000) Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 407:189-194.
270. Takamori S (2006) VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci Res* 55:343-351.
271. Tan BZ, Jiang F, Tan MY, Yu D, Huang H, Shen Y, Soong TW (2011) Functional characterization of alternative splicing in the C terminus of L-type CaV1.3 channels. *J Biol Chem* 286: 42725-42735.
272. Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328:313–318.
273. Teitelbaum SL (2007) Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol* 170:427-435.
274. Therrien C, Dodig D, Karpati G, Sinnreich M (2006) Mutation impact on dysferlin inferred from database analysis and computer-based structural predictions. *J Neurol Sci* 250:71-78.
275. Thoreson WB, Mercer AJ, Cork KM, Szalewski RJ (2013) Lateral mobility of L-type calcium channels in synaptic terminals of retinal bipolar cells. *Mol Vis* 19:16-24.
276. Tian G, Zhou Y, Hajkova D, Miyagi M, Dinculescu A, Hauswirth WW, Palczewski K, Geng R, Alagramam KN, Isosomppi J, Sankila EM, Flannery JG, Imanishi Y (2009) Clarin-1, encoded by the Usher Syndrome III causative gene, forms a membranous microdomain: possible role of clarin-1 in organizing the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 284:18980-18993.

277. Torregrosa-Hetland CJ, Villanueva J, Giner D, Lopez-Font I, Nadal A, Quesada I, Viniegra S, Expósito-Romero G, Gil A, Gonzalez-Velez V, Segura J, Gutiérrez LM (2011) The F-actin cortical network is a major factor influencing the organization of the secretory machinery in chromaffin cells. *J Cell Sci* 124:727-734.
278. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance LKM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev* 62:405–496.
279. Trimble WS, Cowan DM, Scheller RH (1988) VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:4538–4542.
280. Ullrich B, Sudhof TC (1994) Distribution of synaptic markers in the retina: implications for synaptic vesicle traffic in ribbon synapses. *J Physiol Paris* 88:249-257.
281. Ungar D, Hughson FM (2003) SNARE protein structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:493-517.
282. Uthaiyah RC, Hudspeth AJ (2010) Molecular anatomy of the hair cell's ribbon synapse. *J Neurosci* 30:12387-12399.
283. Vaithianathan T, Zanazzi G, Henry D, Akmentin W, Matthews G (2013) Stabilization of spontaneous neurotransmitter release at ribbon synapses by ribbon-specific subtypes of complexin. *J Neurosci* 33:8216-8226.
284. Van Hook MJ, Thoreson WB (2012) Rapid synaptic vesicle endocytosis in cone photoreceptors of salamander retina. *J Neurosci* 32:18112-18123.
285. Verger A, Quinlan KG, Crofts LA, Spano S, Corda D, Kable EP, Braet F, Crossley M (2006) Mechanisms directing the nuclear localization of the CtBP family proteins. *Mol Cell Biol* 26:4882-4894.
286. Vincent PF, Bouleau Y, Safieddine S, Petit C, Dulon D (2014) Exocytotic machineries of vestibular type I and cochlear ribbon synapses display similar intrinsic otoferlin-dependent Ca<sup>2+</sup> sensitivity but a different coupling to Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurosci* 34:10853-10869.
287. Voets T, Toonen RF, Brian EC, de Wit H, Moser T, Rettig J, Sudhof TC, Neher E, Verhage M (2001) Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* 31:581-591.
288. Vogl C, Cooper BH, Neef J, Wojcik SM, Reim K, Reisinger E, Brose N, Rhee JS, Moser T, Wichmann C (2015) Unconventional molecular regulation of synaptic vesicle replenishment in cochlear inner hair cells. *J Cell Sci* 128:638-644.
289. von Gersdorff H, Vardi E, Matthews G, Sterling P (1996) Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released. *Neuron* 16:1221-1227.
290. von Gersdorff H, Matthews G (1999) Electrophysiology of synaptic vesicle cycling. *Annu Rev Physiol* 61:725-752.

291. Wang Y, Sudhof TC (2003) Genomic definition of RIM proteins: evolutionary amplification of a family of synaptic regulatory proteins. *Genomics* 81:126-137.
292. Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Sudhof TC (1997) Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 388:593-598.
293. Wang L, Zou J, Shen Z, Song E, Yang J (2012) Whirlin interacts with espin and modulates its actin-regulatory function: an insight into the mechanism of Usher syndrome type II. *Hum Mol Genet* 21:692-710.
294. Washington NL, Ward S (2006) FER-1 regulates Ca<sup>2+</sup>-mediated membrane fusion during *C. elegans* spermatogenesis. *J Cell Sci* 119:2552-2562.
295. Watanabe S, Rost BR, Camacho-Perez M, Davis MW, Sohl-Kielczynski B, Rosenmund C, Jorgensen EM (2013) Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature* 504:242-247.
296. Weisleder P, Rubel EW (1992) Hair cell regeneration in the avian vestibular epithelium. *Exp Neurol* 115:2-6.
297. Weisz C, Glowatzki E, Fuchs P (2009) The postsynaptic function of type II cochlear afferents. *Nature* 461:1126-1129.
298. Weisz CJ, Lehar M, Hiel H, Glowatzki E, Fuchs PA (2012) Synaptic transfer from outer hair cells to type II afferent fibers in the rat cochlea. *J Neurosci* 32:9528-9536.
299. Wersäll J, Gleisner L, Lundquist PG (1967) Vestibular mechanism: fine structure. Ultrastructure of the vestibular end organs. *Ciba Found Symp* 105-120.
300. Wong AB, Jing ZZ, Rutherford MA, Frank T, Strenzke N, Moser T (2013) Concurrent Maturation of Inner Hair Cell Synaptic Ca<sup>2+</sup> Influx and Auditory Nerve Spontaneous Activity around Hearing Onset in Mice. *Journal of Neuroscience* 33:10661-10666.
301. Wong AB, Rutherford MA, Gabrielaitis M, Pangrsic T, Gottfert F, Frank T, Michanski S, Hell S, Wolf F, Wichmann C, Moser T (2014) Developmental refinement of hair cell synapses tightens the coupling of Ca<sup>2+</sup> influx to exocytosis. *EMBO J* 33:247-264.
302. Xiao H, Chen X, Steele EC, Jr. (2007) Abundant L-type calcium channel Ca(v)1.3 (alpha1D) subunit mRNA is detected in rod photoreceptors of the mouse retina via in situ hybridization. *Mol Vis* 13:764-771.
303. Xue F, Janzen DM, Knecht DA (2010) Contribution of Filopodia to Cell Migration: A Mechanical Link between Protrusion and Contraction. *Int J Cell Biol* 2010:507821.
304. 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.
305. Yasunaga S, Grati M, Chardenoux S, Smith TN, Friedman TB, Lalwani AK, Wilcox ER, Petit C (2000) OTOF encodes multiple long and short isoforms: genetic evidence that the long ones underlie recessive deafness DFNB9. *Am J Hum Genet* 67:591-600.

- 306.Zampini V, Johnson SL, Franz C, Lawrence ND, Munkner S, Engel J, Knipper M, Magistretti J, Masetto S, Marcotti W (2010) Elementary properties of CaV1.3 Ca(2+) channels expressed in mouse cochlear inner hair cells. *J Physiol* 588:187-199.
- 307.Zampini V, Johnson SL, Franz C, Knipper M, Holley MC, Magistretti J, Russo G, Marcotti W, Masetto S (2014) Fine Tuning of CaV1.3 Ca<sup>2+</sup> channel properties in adult inner hair cells positioned in the most sensitive region of the Gerbil Cochlea. *Plos One* 9:e113750.
- 308.Zenisek D, Horst NK, Merrifield C, Sterling P, Matthews G (2004) Visualizing synaptic ribbons in the living cell. *J Neurosci* 24:9752-9759.
- 309.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.
- 310.Zhou W, Jones SW (1996) The effects of external pH on calcium channel currents in bullfrog sympathetic neurons. *Biophys J* 70:1326-1334.
- 311.Zilly FE, Sorensen JB, Jahn R, Lang T (2006) Munc18-bound syntaxin readily forms SNARE complexes with synaptobrevin in native plasma membranes. *PLoS Biol* 4:e330.



## **L'organisation spatiale des canaux calciques Cav1.3 détermine l'efficacité de l'exocytose des synapses à ruban dans les cellules ciliées de l'oreille interne**

**Résumé:** Les cellules ciliées internes (CCIs) de la cochlée encodent les signaux acoustiques en impulsions électriques au niveau des synapses à ruban formées avec les fibres afférentes du nerf auditif. L'exocytose des vésicules glutamatergiques par les CCIs est déclenchée par l'activation des canaux calciques Cav1.3 et par l'otoferline, le senseur calcique intracellulaire présumé. Les mécanismes moléculaires précis régulant cette exocytose restent encore mal compris, notamment ceux à l'origine de sa précision temporelle, sa vitesse élevée en phase avec le signal acoustique ("phase-locking" jusqu'à 1-2 kHz) et son infatigabilité.

Nous montrons que la spécificité des synapses à ruban auditive et vestibulaire passe par une organisation spatiale spécifique des canaux Cav1.3 dans les zones actives. Les CCIs utilisent différentes isoformes de canaux Cav1.3, notamment des isoformes courtes tronquées dans leur partie C-terminale. Ces isoformes courtes (Cav1.3<sub>43S</sub> et Cav1.3<sub>42A</sub>) sont essentiellement impliquées dans le déclenchement et dans l'adaptation rapide de l'exocytose. Cette adaptation se réalise au niveau des canaux Cav1.3 à la fois en intracellulaire par le Ca<sup>2+</sup> et en extracellulaire par les protons sécrétés lors de l'exocytose. Les isoformes longues (Cav1.3<sub>42L</sub> et Cav1.3<sub>Δ44</sub>), positionnées en périphérie du ruban, réguleraient le recrutement vésiculaire. Par ailleurs, nous montrons que l'organisation spatiale des canaux Cav1.3 est dépendante d'un cytosquelette d'actine-F au ruban synaptique. La clarine 1 (protéine Usher IIIA) interagirait avec l'actine-F, l'harmonine (protéine PDZ, Usher IC) et la sous-unité β2 des canaux calciques pour organiser les canaux Cav1.3 dans les zones actives.

**Mots clés:** Audition; Vestibule; Cellules ciliées; Transmission synaptique; Otoferline; Canaux calciques Cav1.3; synapses à ruban; Syndrome d'Usher

---

## **Spatial organization of the Cav1.3 channels underlies the exocytosis efficiency of hair cell ribbon synapses in the inner ear**

**Abstract:** Cochlear inner hair cells (IHCs) encode acoustic signals into nerve impulses at their ribbon synapses formed with the auditory afferent fibers. The exocytosis of glutamatergic vesicles is triggered by voltage activation of Cav1.3 channels and requires otoferlin, the putative intracellular Ca<sup>2+</sup> sensor. The precise molecular mechanisms of exocytosis still remain elusive, notably the mechanisms allowing the temporal precision, the high rates of vesicular fusion (high frequency phase-locking with sound) and the indefatigability of the process.

We show here that exocytosis in auditory and vestibular hair cells relies on a specific tight spatial organization of Cav1.3 channels at the active zones. Auditory IHCs use different Cav1.3 isoforms, notably short C-terminal isoforms (Cav1.3<sub>43S</sub> et Cav1.3<sub>42A</sub>). These short Cav1.3 isoforms essentially trigger the RRP exocytosis (Readily Releasable Pool of vesicles) and are at the origin of its fast adaptation. This fast exocytotic adaptation is based both on an intracellular Ca<sup>2+</sup> dependant inactivation of the Ca<sup>2+</sup> current and on its extracellular block by exocytosed protons. Long Cav1.3 isoforms (Cav1.3<sub>42L</sub> et Cav1.3<sub>Δ44</sub>) regulate the vesicular recruitment at the active zones. Furthermore, our results show that a synaptic actin cytoskeleton is essential for the tight spatial organization of the Cav1.3 channels at the ribbons. Clarin 1 (Usher IIIA protein), through its interactions with the F-actin network, harmonin (PDZ protein, Usher IC) and the Ca<sup>2+</sup> channel β2 subunit, is required to maintain the tight organization of Cav1.3 channels at the ribbon synapses.

**Keywords:** Audition; Vestibule; Hair cells; Synaptic transmission; Otoferlin; Cav1.3 channels; Ribbon synapses; Usher Syndrom