



**HAL**  
open science

# Exploration du rôle des différents domaines C2 de l'otoferline et des isoformes des canaux calciques CaV1.3 dans la transmission synaptique des cellules ciliées auditives

Margot Tertrais

## ► To cite this version:

Margot Tertrais. Exploration du rôle des différents domaines C2 de l'otoferline et des isoformes des canaux calciques CaV1.3 dans la transmission synaptique des cellules ciliées auditives. Neurosciences. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0435 . tel-02111896

**HAL Id: tel-02111896**

**<https://theses.hal.science/tel-02111896v1>**

Submitted on 12 Jun 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 des Sciences de la Vie et de la Santé  
Spécialité NEUROSCIENCES

**Exploration du rôle des différents domaines C2 de l'otoferline  
et des isoformes des canaux calciques Ca<sub>v</sub>1.3  
dans la transmission synaptique des cellules ciliées auditives**

Par Margot TERTRAIS

sous la direction du Dr. Didier Dulon  
au laboratoire de Neurophysiologie de la Synapse Auditive  
INSERM U1120 CHU Pellegrin

Soutenue publiquement le 19 décembre 2018

**Membres du Jury :**

Président : Vincent Darrouzet, Professeur, Chef du service ORL, CHU, Bordeaux

Rapporteur : Gwenaëlle Géléoc, Professeur, Ecole de Médecine de Harvard, USA

Rapporteur : Brigitte Malgrange, Professeur, Université de Liège, Belgique

Examineur : Mireille Montcouquiol, Directeur de recherche INSERM, Université de Bordeaux

Examineur : Marc Bartoli, Directeur de recherche CNRS, Université Aix-Marseille

Directeur de Thèse : Didier Dulon, Directeur de recherche INSERM, Université de Bordeaux

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement le Pr Gwenaëlle Géléoc et le Pr Brigitte Malgrange d'avoir accepté de lire, d'expertiser et de se déplacer pour ce travail de doctorat; le Dr Mireille Montcouquiol et le Dr Marc Bartoli, d'avoir accepté d'être examinateurs dans ce jury de thèse et le Pr Vincent Darrouzet d'en être le Président.

Merci à la *Fondation pour l'Audition*, pour le soutien financier de ces trois ans de thèse

Merci **Didier** de m'avoir permis de réaliser ce projet à part entière qu'est le doctorat, de m'avoir supervisée, conseillée et accompagnée dans les manips au quotidien, mais aussi dans les multiples rédactions et relectures de papiers et manuscrits

Pour avoir été là du premier au dernier jour, pour avoir su m'accompagner, me soutenir, m'écouter dans les bons moments comme dans les mauvaises passes; pour être tout simplement indispensable au laboratoire, (tout comme l'otoferline l'est à notre audition !) pour nos échanges et ta bienveillance, un immense merci **Yohan** !

Merci **Gilles** (toi qui adore les remerciements) pour toutes nos petites discussions du matin, ta gentillesse, d'avoir pris le temps de me relire, et pour tes superbes talents de cuisinier qui ont magnifiés, entre autres, nos repas de Noël

Pour avoir été un modèle à suivre, pour ta disponibilité, tes explications et tes réponses à toutes mes questions, pour nos partages sur cette aventure qu'est la thèse, pour ton culte au dieu du patch, pour nos innombrables mails scientifiques et pas que, merci beaucoup beaucoup **Philippe** !

Un merci tout particulier à **Séverin**, pour tes talents d'orateur et pour avoir eu toujours mille et une anecdotes trépidantes à raconter, pour tes Kinder et tes exagérations réconfortantes, pour avoir fait de Hanovre une histoire drôle

Merci à toute l'**équipe de Pasteur** (Said, Aziz, Nicolas, Gaëlle, Charlotte...) que j'ai croisé et recroisé, pour nos échanges et partages constructifs; merci particulièrement à Alice pour m'avoir appris l'injection intra-cochléaire

Merci à mes petites stagiaires **Delphine et Maialenn** que j'ai vu évoluer et prendre confiance en elles; merci pour votre implication et votre aide les filles !

Merci à **Julien** d'avoir pris soin de nos petites souris, consciencieusement et toujours avec le sourire, bonne continuation dans tes études !

Pour tes heures passées aux ABR, merci **Jean-Christophe** pour ton imagination et tout le gain de temps

Merci **Thibault** d'avoir partagé les galères du patch et des 3'-5', je te passe le relais maintenant

Pour m'avoir donné le goût des neurosciences, de la recherche et de ses innombrables hypothèses, sans qui je n'en serai pas là, merci **Olivier** pour tes conseils

Merci également à **Maurice** et **Magali**, pour le stage de M2 qui a été une étape cruciale avant de commencer la thèse

Pour avoir cru en moi et m'avoir épaulé durant l'éprouvant concours de l'école doc, merci **Pierre-Olivier** de votre soutien

D'avoir été présents malgré la distance, parce que à chaque fois, c'est comme si on ne s'était quittés, merci **Victoria** (et toutes tes péripéties outre-Atlantique) et merci à mes petits bretons de toujours : **Marion** (et nos crêperies), **Marie** (et tes aventures capillaires), **Thibaud** (et nos heures à refaire le monde), **Guillaume** (et nos messages toujours plus longs)

Pour m'avoir accueillie comme chez moi au sein du dojo, merci **Armand** pour ta bonne humeur, les geckos et courbatures quotidiennes

Pour nos trajets hebdomadaires, nos états d'âme, pour avoir souffert ensemble sur le tatami, merci **Bastien** d'avoir été mon partenaire

D'avoir partagé et échangé sur nos vies de thésards (et pas que !), pouvoir raconter nos anecdotes mutuelles m'a fait le plus grand bien, **Fab' et Paô**, un grand merci à vous ! Bon vent pour la suite de vos aventures!

Pour avoir été là, de m'avoir écoutée, conseillée, regonflée; pour nos discussions, confidences, notre complicité et notre confiance mutuelle; nos fous rires, Pey Berland, Biarritz et le brouillard d'un soir d'été, M-e-r-c-i ma **Julie** !

Pour avoir suivi toute cette aventure, pour nos innombrables coups de téléphones, votre soutien sans faille, merci beaucoup à mes **grands-parents**

A mes **ptits frères**, merci pour chacune de nos retrouvailles, nos feux de camps et nos partages de vies, je suis fière de vous !

Pour croire en moi, être toujours présents et m'écouter pendant des heures, relativiser, revitaliser, pour toutes ces bouffées d'oxygène iodé qui ont été de vous voir, pour poser et se reposer, une chose à la fois, milles mercis **Papa Maman** !

Pour tout et plus encore,  
Comme une évidence,  
Merci à **P-H**

# Résumé

## **Exploration du rôle des différents domaines C2 de l'otoférline et des isoformes des canaux calciques Cav1.3 dans la transmission synaptique des cellules ciliées auditives**

L'encodage du signal acoustique en impulsions nerveuses se réalise au niveau des synapses à ruban des cellules ciliées internes (CCI) de la cochlée. Une dépolarisation déclenche l'exocytose des vésicules synaptiques suite à l'activation des canaux calciques  $Ca_v1.3$  et à l'action d'un senseur calcique particulier, l'otoférline, une grande protéine se composant d'un domaine transmembranaire en C-terminal et de six domaines C2 (A-F) pouvant lier le  $Ca^{2+}$  et les phospholipides. Afin de caractériser le rôle de ces différents domaines C2, nous avons utilisé des vecteurs viraux (AAV) permettant l'expression de formes raccourcies de l'otoférline (mini-Otof) *in vivo* dans les CCI de souris dépourvues d'otoférline (*Otof*<sup>-/-</sup>). Nous montrons que les mini-Otof contenant les domaines C2-EF, C2-DEF ou C2-ACEF sont suffisantes pour restaurer l'exocytose rapide des CCI *Otof*<sup>-/-</sup>, sans toutefois restaurer l'audition car le recrutement des vésicules synaptiques reste altéré. Nous révélons pour la première fois la présence d'une endocytose ultra-rapide ( $\tau < 20$  ms) dynamine- et otoferline-dépendante, une fonction certainement essentielle à l'homéostasie membranaire des CCI. L'expression des mini-Otof C2-DEF a également permis de restaurer partiellement la composante rapide de l'inactivation du courant calcique des CCI, celle-ci étant absente chez les souris *Otof*<sup>-/-</sup>. Cette inactivation rapide est réalisée par les isoformes courtes  $Ca_v1.3_S$  qui ont leur partie C-terminale régulatrice tronquée, contrairement aux isoformes longues  $Ca_v1.3_L$  dépourvues d'inactivation. Afin de différencier les rôles spécifiques de ces isoformes dans le cycle des vésicules synaptiques, nous avons utilisé la technologie CRISPR-Cas9, nous permettant d'éditer spécifiquement la partie C-terminale régulatrice des canaux  $Ca_v1.3_L$ . Nos résultats montrent que les souris CRISPR- $Ca_v1.3_L$  présentent une surdité sévère expliquée au niveau des CCI par un défaut de recrutement vésiculaire aux zones actives, alors que les  $Ca_v1.3_S$  inaltérés contrôlent la fusion rapide des vésicules synaptiques.

### **Exploring the role of the various C2 domains of otoferlin and isoforms of calcium channels Cav1.3 in synaptic transmission of auditory hair cells**

The precise encoding of acoustic signals into nerve impulses is achieved at the ribbon synapses of inner hair cells (IHC) of the cochlea. Exocytosis of synaptic vesicles by IHC is triggered by voltage-activation of  $Ca_v1.3$  calcium channels and the action of a specific calcium sensor, otoferlin, a large protein with a single C-terminal transmembrane domain and six C2 (A-F) domains which binds  $Ca^{2+}$  and interacts with phospholipids. In order to characterize the function of the various otoferlin C2 domains, we used viral vectors (AAV) allowing the expression of shortened forms of otoferlin (mini-Otof), *in vivo*, in IHC from mice lacking otoferlin (*Otof*<sup>-/-</sup>). We show that mini-Otof containing C2-EF, C2-DEF or C2-ACEF domains are sufficient to restore fast synaptic vesicle exocytosis in *Otof*<sup>-/-</sup> IHC, but without restoring hearing because vesicular replenishment remains impaired. For the first time, we also uncover an ultra-fast endocytosis ( $\tau < 20$  ms) dynamin- and otoferlin-dependant, a function that is certainly essential for a fast regulation of IHC membrane homeostasis. Furthermore, the expression of the mini-Otof C2-DEF also partially restored the fast component of the  $Ca^{2+}$  current inactivation in *Otof*<sup>-/-</sup> IHC. This rapid inactivation is carried out by  $Ca_v1.3_S$  short isoforms which have a truncated C-terminal regulatory domain, unlike  $Ca_v1.3_L$  long isoforms which display no inactivation. To characterize the specific role of these  $Ca_v1.3$  isoforms, we used CRISPR-Cas9 technology, allowing a specific removal of the C-terminal regulatory part of the  $Ca_v1.3_L$  channels in IHC. Our results show that CRISPR- $Ca_v1.3_L$  mice display severe deafness explained at the IHC level by a defect in vesicular replenishment of the active zones, while  $Ca_v1.3_S$  are sufficient to ensure fast and transient exocytosis of docked synaptic vesicles.

# **Sommaire**



<b>Publications Scientifiques.....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des Abréviations.....</b>	<b>4</b>
<b>Liste des Figures et Tableaux.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>8</b>
<b>Chapitre 1 : Mécanismes de la transduction auditive.....</b>	<b>9</b>
A) L'oreille.....	9
B) La cochlée.....	10
a) <u>Organisation fonctionnelle</u> .....	10
b) <u>Organe de Corti</u> .....	11
c) <u>Morphologie et activité des cellules ciliées</u> .....	12
- Pôle apical des cellules ciliées et mécanotransduction.....	12
- Les cellules ciliées externes (CCE).....	15
- Les cellules ciliées internes (CCI).....	16
d) <u>Innervation afférente et efférente des cellules ciliées</u> .....	19
C) La voie auditive centrale.....	20
a) <u>Les noyaux cochléaires</u> .....	21
b) <u>Le complexe olivaire supérieur</u> .....	21
c) <u>Le colliculus inférieur</u> .....	21
d) <u>Le thalamus (corps géniculé médian)</u> .....	22
D) Surdités.....	22
<b>Chapitre 2 : Le cycle vésiculaire des synapses centrales.....</b>	<b>23</b>
A) Exocytose.....	24
a) <u>Les protéines SNAREs</u> .....	24
b) <u>Les senseurs calciques : les synaptotagmines</u> .....	25
B) Endocytose.....	25
a) <u>Endocytose clathrine-dépendante</u> .....	25
b) <u>Endocytoses clathrine-indépendantes</u> .....	26
<b>Chapitre 3 : Le cycle vésiculaire des cellules ciliées internes (CCI).....</b>	<b>28</b>
A) Exocytose.....	28
a) <u>Les protéines SNAREs</u> .....	28
b) <u>Absence des synaptotagmines</u> .....	28
c) <u>Fusion multi-vésiculaire ou univésiculaire ?</u> .....	29
B) Endocytose.....	29
a) <u>Acteurs</u> .....	30
b) <u>Différentes voies</u> .....	30
<b>Chapitre 4 : Otoferline.....</b>	<b>31</b>
A) Mutations et Surdité.....	31
B) Structure de l'otoferline.....	31
a) <u>Domaines C2</u> .....	31
b) <u>Isoformes de l'otoferline</u> .....	32
C) Expression et localisation de l'otoferline.....	33
D) Interactions de l'otoferline.....	33
E) Rôles de l'otoferline.....	34
F) Ferlines.....	35

a) <u>Myoferline</u> .....	36
b) <u>Dysferline</u> .....	36
<b>Chapitre 5 : Les canaux calciques</b> .....	<b>39</b>
A) Familles et sous-unités des canaux calciques.....	39
B) Inactivation des canaux calciques Ca <sub>v</sub> 1.3.....	40
a) <u>Inactivation par le Ca<sup>2+</sup></u> .....	40
b) <u>Inactivation par les protons (H<sup>+</sup>)</u> .....	41
C) Rôle des canaux Ca <sub>v</sub> 1.3 dans les CCI.....	42
<b>Chapitre 6 : Objectifs de la Thèse</b> .....	<b>44</b>
A) Préciser le rôle de l'otoferline dans le cycle vésiculaire synaptique des CCI.....	44
B) Caractériser le rôle des différents domaines C2 de l'otoferline dans l'exocytose synaptique des CCI.....	44
C) Mettre en évidence l'existence d'une endocytose ultra-rapide dans les CCI.....	45
D) Caractériser le rôle des isoformes des canaux calciques Ca <sub>v</sub> 1.3 dans l'exocytose synaptique des CCI.....	46
<b>Chapitre 7 : Expression de mini-otoferlines dans les CCI de souris <i>Otof</i><sup>-/-</sup> par injection intra-cochléaire de vecteur AAV</b> .....	<b>48</b>
A) Choix entre vecteurs viraux et non-viraux.....	48
B) Les AAV.....	49
C) Thérapie génique par expression d'AAV dans la cochlée.....	52
D) Injection intra-cochléaire d'AAV <i>via</i> la fenêtre ronde.....	53
<b>Chapitre 8 : Exploration du rôle spécifique d'isoformes des canaux calciques Ca<sub>v</sub>1.3 des CCI : approche in vivo chez la souris par édition génique CRISPR-Cas9</b> .....	<b>54</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>57</b>
<b>Résumé de l'article 1</b> .....	<b>58</b>
<u>Article 1</u> : Otofelin acts as a Ca <sup>2+</sup> sensor for vesicle fusion and vesicle pool replenishment at auditory hair cell ribbon synapses (2017, eLife 6: e31013) .....	60
<b>Résumé de l'article 2</b> .....	<b>94</b>
<u>Article 2</u> : Viral transfer of mini-otoferlins partially restores the fast component of exocytosis and uncovers ultrafast endocytosis in auditory hair cells of otoferlin knock-out mice (2018 Journal of Neuroscience, sous presse).....	96
<b>Résumé de l'article 3</b> .....	<b>149</b>
<u>Article 3</u> : The use of CRISPR-Cas9 genome editing in vivo to probe the role of Ca <sub>v</sub> 1.3 Ca <sup>2+</sup> channel isoforms in synaptic transmission of mouse auditory hair cells (Manuscrit en préparation).....	151
Investigations complémentaires sur l'article 3 .....	174
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>176</b>
<b>Chapitre I : Rôle de l'otoferline dans l'exocytose rapide et soutenue des CCI</b> .....	<b>177</b>
<b>Chapitre II : Rôle des domaines C2 de l'otoferline dans l'exocytose des CCI</b> .....	<b>179</b>
A) Mini-otoferlines.....	179

a) <u>C2-EF</u> .....	179
b) <u>C2-DEF</u> .....	180
c) <u>C2-ACEF et C2-ACDF</u> .....	180
d) <u>Préservation des rubans synaptiques</u> .....	181
B) Rôle de l'otoferline dans l'inactivation rapide du courant calcique .....	182
C) Mise en évidence d'une endocytose ultra-rapide dépendante de la dynamine et de l'otoferline.....	182
a) <u>Dynamine-dépendance</u> .....	183
b) <u>Actine-F</u> .....	184
c) <u>Endocytose ultra-rapide des synapses centrale</u> .....	185
<b>Chapitre III : Perspectives de thérapie génique de l'oreille interne.....</b>	<b>186</b>
A) Utilisation d'autres vecteurs.....	186
B) Propriétés de concatémérisation des AAV.....	186
C) Essais cliniques.....	187
D) La complexité de l'otoferline.....	187
E) Autre thérapie cochléaire envisagée : la thérapie cellulaire.....	188
<b>Chapitre IV : Étude du rôle des isoformes des canaux Ca<sub>v</sub>1.3 dans la transmission synaptique des CCI par édition génique CRISPR-Cas9.....</b>	<b>190</b>
A) Expression de l'enzyme Cas9.....	190
B) Rôle des isoformes Ca <sub>v</sub> 1.3 <sub>L</sub> des CCI.....	191
<b>Chapitre V : Perspectives de l'édition génique CRISPR-Cas9 appliquée aux pathologies de l'oreille internes.....</b>	<b>193</b>
A) Edition du génome et pathologies de l'organe de Corti.....	193
B) Supprimer l'expression d'un gène.....	193
C) Évolution de l'édition génique par CRISPR-Cas9 .....	194
<b>Chapitre VI : Conclusion générale.....</b>	<b>195</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>197</b>

**Publications**  
**Scientifiques**

**Articles scientifiques :**

- 1) **Tertrais M**, Bouleau Y, Emptoz A, Belleudy S, Sutton RB, Petit C, Safieddine S and Dulon D (2019) Viral transfer of mini-otoferlins partially restores the fast component of exocytosis and uncovers ultrafast endocytosis in auditory hair cells of otoferlin knock-out mice. *Journal of Neuroscience* (sous presse)
- 2) **Tertrais M**, Bouleau Y, Leclère JC, Peineau T and Dulon D (2018). The use of CRISPR-Cas9 genome editing in vivo to probe the role of Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channel isoforms in synaptic transmission of mouse auditory hair cells. (manuscrit en préparation)
- 3) Michalski N, Goutman JD, Auclair SM, Boutet de Monvel J, **Tertrais M**, Emptoz A, Parrin A, Nouaille S, Guillon M, Sachse M, Ciric D, Bahloul A, Hardelin JP, Sutton RB, Avan P, Krishnakumar SS, Rothman JE, Dulon D, Safieddine S and Petit C (2017). Otoferlin acts as a Ca<sup>2+</sup> sensor for vesicle fusion and vesicle pool replenishment at auditory hair cell ribbon synapses. *eLife* 6: e31013.
- 4) Dulon D, Papal S, Patni P, Cortese M, Vincent PF, **Tertrais M**, Emptoz A, Tlili A, Bouleau Y, Michel V, Delmaghani S, Aghaie A, Pepermans E, Alegria-Prevot O, Akil O, Lustig L, Avan P, Safieddine S, Petit C, El-Amraoui A. (2018) Clarin-1 gene transfer rescues auditory synaptopathy in model of Usher syndrome. *J Clin Invest* 1;128(8):3382-3401
- 5) Vincent PF, Cho S, **Tertrais M**, Bouleau Y, von Gersdorff H and Dulon D (2018) Clustered Ca<sup>2+</sup> channels are blocked by synaptic vesicle proton release at mammalian auditory ribbon synapses. *Cell Rep.* 25:3451-3464
- 6) Du Z, **Tertrais M**, Courtand G, Leste-Lasserre T, Cardoit L, Masméjean F, Halgand C, Cho YH and Garret M (2017) Differential alteration in expression of striatal GABA<sub>A</sub>R subunits in mouse models of Huntington's disease. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:198

**Communications aux congrès :**

**Tertrais M**, Courtand G, Halgand C, Du Z and Garret M. Localization of GABAA receptors subunits in the different neuronal population within the mouse striatum. Bordeaux Neurocampus/ BRAIN symposium, Bordeaux, 2015/05/06

**Tertrais M**, Bouleau Y, Vincent P and Dulon D. Otoferlin : a calcium sensor for ultrafast exo-endocytosis at auditory ribbon synapses. Journée de l'Ecole Doctorale SVS. Talence, 12/04/2017

**Tertrais M**, Emptoz A, Bouleau Y, Belleudy S, Petit C, Safieddine S and Dulon D. Viral gene transfer of short otoferlins partially restores the fast component of synaptic exocytosis in auditory hair cell from OTOF knock-out mice. IEB, Hanovre, Allemagne, 2017/09/13

Belleudy S, **Tertrais M**, Bouleau Y, Dulon D. Age-related structural changes in synaptic ribbons of mouse cochlear inner hair cells lacking otoferlin IEB, Hanovre, Allemagne, 2017/09/13

**Tertrais M**, Emptoz A, Bouleau Y, Belleudy S, Petit C, Safieddine S and Dulon D. Viral gene transfer of short otoferlins partially restores the fast component of synaptic exocytosis in auditory hair cell from OTOF knock-out mice. ISIET, Marrakech, Maroc, 2017/11/02. 2017  
ISIET Poster Award, 2nd Prize for Best Poster Presentation

**Tertrais M**, Emptoz A, Bouleau Y, Belleudy S, Petit C, Safieddine S and Dulon D. Viral gene transfer of short otoferlins partially restores the fast component of synaptic exocytosis in auditory hair cell from OTOF knock-out mice. San Diego, USA, 2018/02/10

**Tertrais M**, Bouleau Y, Leclère JC, Peineau T and Dulon D. The use of CRISPR-Cas9 genome editing technology in vivo to probe the role of synaptic protein isoforms in mouse auditory hair cells. Journée de l'Ecole Doctorale SVS. Talence, 18/04/2018

**Tertrais M**, Bouleau Y, Leclère JC, Peineau T and Dulon D. The use of CRISPR-Cas9 genome editing technology in vivo to probe the role of synaptic protein isoforms in mouse auditory hair cells. Bordeaux Neurocampus Day, Bordeaux 2018/04/18

# Liste des Abréviations

**aa** : acides aminés  
**AAV** : Adeno Associated Virus  
**ABR** : Auditory Brainstem Response (ou PEA pour Potentiels évoqués auditifs)  
**AMPA** :  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolepropionic acid  
**AP-2** : adapter protein-2  
**ASO** : oligonucléotides anti-sens  
**ATP** : Adenosine triphosphate  
**CaM** : Calmoduline  
**CaBP** : Calcium Binding Protein  
**Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub>** : Isoforme longue du canal Cav1.3  
**Ca<sub>v</sub>1.3<sub>S</sub>** : Isoforme courte ("short") du canal Cav1.3  
**CCE** : Cellules Ciliées Externes  
**CCI** : Cellules Ciliées Internes  
**CDI** : Calcium-dépendant inactivation  
**CME** : Clathrin-mediated endocytosis  
**CRISPR** : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats  
**CRSIPR-Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub>** : Edition génique des isoformes Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub> par CRISPR-Cas9  
**dB** : Décibel  
**DCRD** : Distal Carboxy terminal Regulatory Domain  
**DFNB9** : Deafness autosomal recessive 9  
**DPOAE** : Distortion product otoacoustic emissions  
**EGTA** : Ethylene Glycol Tetra-acetic Acid  
**EPSC** : Excitatory post-synaptic currents  
**GTP** : Guanosine triphosphate  
**gRNA** : ARN guide  
**HEK** : Human Embryonic Kidney cells  
**HDR** : Homology direct repair  
**indels** : Insertions-deletions  
**ITR** : Inverted terminal repeats  
**MT** : Mécanotransduction  
**NHEJ** : Non homologous end joining  
**NSF** : N-ethylmaleimide sensitive factor  
**OC** : Organe de Corti  
**PAM** : Protospacer Adjacent Motif  
**PCRD** : Proximal Carboxy-terminal Regulatory Domain  
**RRP** : Readily Releasable Pool  
**SNC** : Système nerveux central  
**SNAP 25** : Synaptosomal-associated protein 25  
**SNARE** : Soluble NSF Attachment protein Receptor  
**Syt** : Synaptotagmine  
**TM** : Transmembranaire  
**TMC (1 et 2)** : Transmembrane channel-like protein  
**V-ATPase** : Pompe à proton vésiculaire  
**V-GLUT** : Transporteur vésiculaire du glutamate  
**ZA** : Zone Active  
 **$\Delta$ Cm** : Variations de capacité membranaire



# Liste des Figures et Tableaux

**Figure 1 :** Représentation schématique de l'oreille humaine

**Figure 2 :** Représentation d'une coupe transversale de la cochlée

**Figure 3 :** Représentation schématique de l'organe de Corti

**Figure 4 :** Les stéréocils des cellules ciliées

**Figure 5 :** Représentation schématique de la synapse à ruban des CCI

**Figure 6 :** Schéma d'une coupe sagittale de l'encéphale humain

**Figure 7 :** Représentation schématique du cycle vésiculaire des synapses du système nerveux central

**Figure 8 :** Les protéines SNARES

**Figure 9 :** Endocytose médiée par la clathrine (CME)

**Figure 10 :** Exocytoses clathrine-indépendantes

**Figure 11 :** Représentation schématique des isoformes de l'otoférine

**Figure 12 :** Représentation schématique de la structure de l'otoférine, la myoferline et la dysferline

**Figure 13 :** Représentation schématique de l'otoférine, la synaptotagmine et de formes courtes de l'otoférine (mini-Otof)

**Figure 14 :** Isoformes de canaux calciques  $Ca_v1.3$

**Figure 15 :** Composition d'un AAV sauvage

**Figure 16 :** Représentation schématique de la production d'AAV

**Figure 17 :** Système du complexe CRISPR-Cas9

**Figure 18 :** Schéma simplifié récapitulatif de l'organisation du cycle vésiculaire à la synapse des CCI

**Tableau 1 :** Résumé des liaisons ou interactions potentielles de chaque domaine C2 de l'otoférine

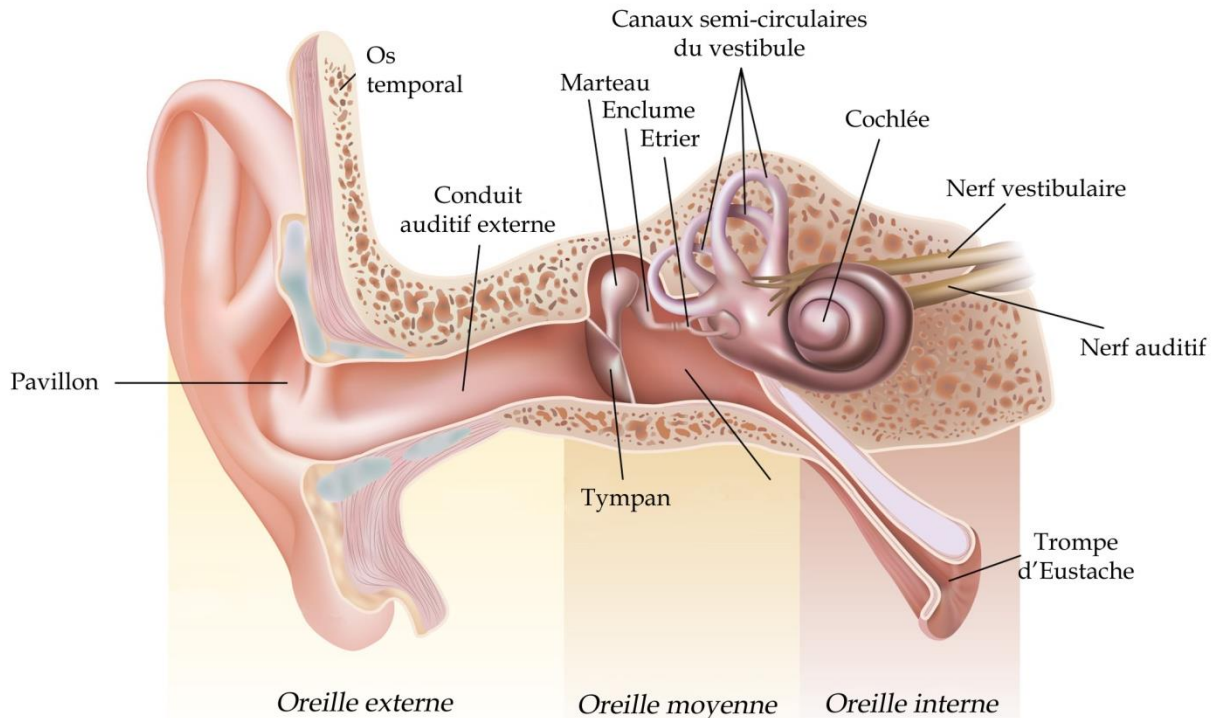
**Tableau 2 :** Avantages/inconvénients des vecteurs viraux et non viraux

# **Introduction**

## Chapitre 1: Mécanismes de la transduction auditive

### A) L'oreille

L'oreille se divise en trois parties, l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne (*Fig.1*). L'oreille externe se compose du pavillon (partie visible) et du conduit auditif externe. Le pavillon est constitué de cartilage qui dessine des reliefs propres à chaque individu. Il permet de diffracter et de collecter les ondes sonores dans le conduit auditif, ce dernier jouant le rôle de caisse de résonance propageant les ondes acoustiques jusqu'au tympan. L'oreille moyenne se compose de cette membrane tympanique qui est reliée à une chaîne de trois osselets articulés entre eux, le marteau, l'enclume et l'étrier (*Fig.1*). Lorsqu'une onde sonore aérienne se propage le long du conduit auditif externe, la membrane tympanique transmet les vibrations perçues à la chaîne des osselets se terminant par l'étrier, qui est inséré dans la fenêtre ovale de la cochlée, l'organe de l'audition situé dans l'oreille interne. L'oreille moyenne réalise ainsi une adaptation d'impédance extrêmement fine des ondes acoustiques entre le milieu aérien de l'oreille externe et le milieu liquidien cochléaire. L'oreille interne, comprend en plus de la cochlée, un deuxième organe sensoriel, le vestibule, organe de l'équilibre. Ce dernier se situe au pôle postérieur de la cochlée et permet le maintien de la posture ainsi que la détection de la position et de l'accélération de la tête dans l'espace.

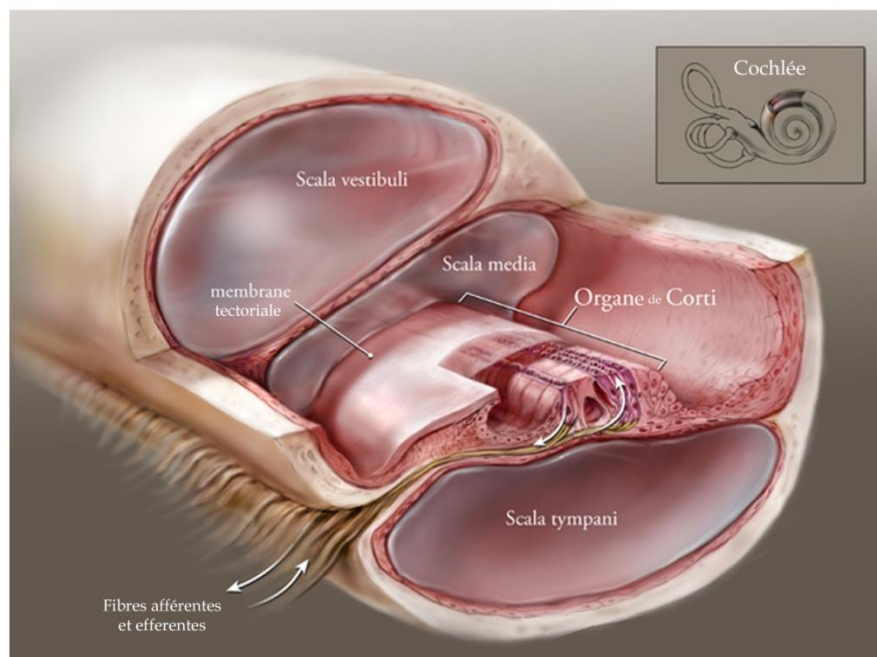


**Figure 1 : Représentation schématique de l'oreille humaine.** L'oreille externe se compose du pavillon et du conduit auditif externe. L'oreille moyenne comprend le tympan et la chaîne des osselets. L'oreille interne se compose du vestibule, organe de l'équilibre, et de la cochlée, organe de l'audition. (Image adaptée de : *Thompsons Road Physiotherapy*).

## B) La cochlée

### a) Organisation fonctionnelle

La cochlée, située dans l'os temporal, est une petite structure (35 mm de hauteur chez l'Homme) qui s'enroule en spirale, ressemblant à une coquille d'escargot d'où son nom issu de "coquillage" en grec. Le nombre de tours, ou spires, varie entre les espèces et la cochlée humaine, compte deux spires et demie. Dans la cochlée se trouvent trois rampes : la rampe vestibulaire (*scala vestibuli*), la rampe tympanique (*scala tympani*) et la rampe médiane (*scala media* ou canal cochléaire) (Fig.2).



**Figure 2 : Représentation d'une coupe transversale de la cochlée.** La rampe vestibulaire (*Scala vestibuli*) et la rampe tympanique (*Scala tympani*) sont remplies de périlymphe tandis que le canal cochléaire (*Scala media*) contient de l'endolymphe. Entre la rampe médiane et la rampe tympanique, se situe l'organe sensoriel auditif : l'organe de Corti. (Image adaptée de : © Shiz Aoki | Anatomize.com 2018).

La rampe vestibulaire est apicale, dans le prolongement de la fenêtre ovale sur laquelle s'appuie l'étrier. La rampe tympanique est située à la base, dans le prolongement de la fenêtre ronde. La fenêtre ronde est une capsule osseuse fermée par une fine membrane qui sépare l'oreille moyenne de l'oreille interne et sert de soupape, d'échappement de pression. Les deux rampes sont remplies par la périlymphe, un milieu extracellulaire riche en sodium ( $\text{Na}^{2+}$  : 140 mM) et pauvre en calcium et potassium ( $\text{Ca}^{2+}$  : 1,2 mM et  $\text{K}^{+}$  : 5 mM). Les deux rampes se rejoignent par l'hélicotreme, un petit orifice situé à l'apex de la cochlée. Le canal cochléaire, lui, se situe entre les deux rampes dont il est séparé par la membrane de Reissner et la membrane basilaire.

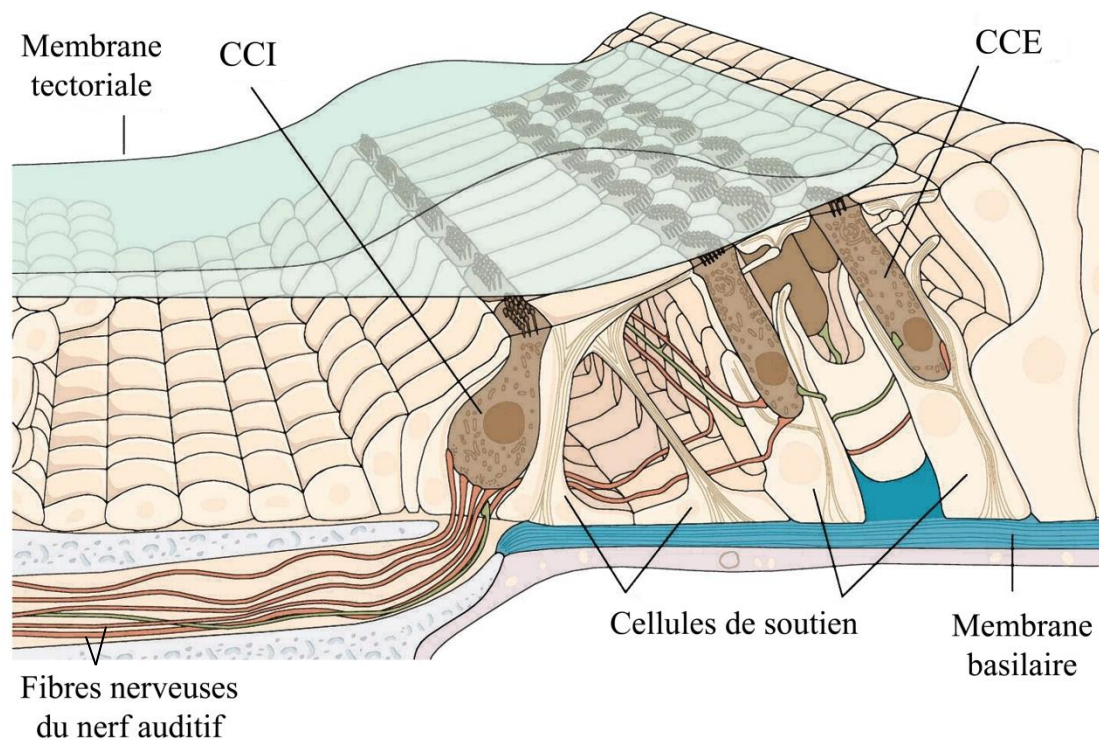
La membrane basilaire, de par ses propriétés d'élasticités, agit comme un résonateur mécanique sur lequel se propage l'onde sonore. En rentrant en résonance à des fréquences sonores particulières le long de la cochlée, avec sa partie basale détectant les sons aigus de hautes fréquences et sa partie apicale détectant les sons graves à basses fréquences, la membrane basilaire participe à la tonotopie cochléaire passive.

Le canal cochléaire central contient l'endolymphe dont la composition ionique est très particulière puisqu'elle est très riche en  $K^+$  (150 mM) et pauvre en  $Na^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  (1 mM et 25  $\mu$ M respectivement). Cette composition lui confère un potentiel positif de + 80 mV par rapport à la périlymphe et d'environ + 140 mV par rapport au cytoplasme des cellules ciliées sensorielles auditives, ce qui lui fournit un gradient électrochimique très favorable en faveur d'une entrée d'ion  $K^+$  dans les cellules sensorielles lors de leur stimulation mécanique. Cet influx potassique est à l'origine du potentiel récepteur acoustique, ou potentiel microphonique. La concentration élevée de  $K^+$  ainsi que le potentiel de l'endolymphe sont activement maintenus par la strie vasculaire à l'aide de pompes Na/K ATPase. La strie vasculaire, située en latéral du canal cochléaire, est une structure épithéliale complexe composée de cellules basales et marginales, ainsi que de vaisseaux sanguins permettant l'apport en oxygène et nutriments. Entre le canal cochléaire et la rampe tympanique, sur la membrane basilaire, se situe l'organe sensoriel auditif : l'organe de Corti.

#### b) Organe de Corti

L'organe de Corti est l'épithélium sensoriel auditif à l'origine de la transduction du signal sonore en signal électrique. Il porte le nom de l'anatomiste Alfonso Corti qui fut le premier à en établir une description anatomique détaillée en 1851. L'organe de Corti se compose de différents types cellulaires ayant des rôles variés. Les cellules de soutien permettent de maintenir l'intégrité mécanique de l'épithélium sensoriel et l'homéostasie ionique de la périlymphe, tandis que les cellules ciliées sensorielles sont les actrices principales de l'encodage du signal acoustique et de son amplification. Il en existe 2 types : les internes (CCI) et les externes (CCE) (*Fig.3*).

Les cellules ciliées internes (CCI), au nombre de 3500 chez l'Homme (Rask-Andersen et al., 2012) sont disposées en une rangée sur l'axe intérieur de l'organe de Corti. Elles encodent le signal acoustique et le potentiel microphonique en impulsions électriques aux niveaux de leurs synapses très particulières, dites synapses à ruban, avec les fibres nerveuses du nerf auditif. Les CCI sont ainsi responsables de la transmission afférente des informations acoustiques depuis la cochlée vers le cortex auditif. Les synapses à ruban des CCI encodent, par la vitesse de décharge des impulsions électriques des fibres nerveuses du nerf auditif, à la fois l'information temporelle (la fréquence par "phase-locking") et l'intensité d'une stimulation sonore. De façon remarquable, l'activité synaptique des CCI est quasiment infatigable et permet la localisation d'un son dans l'espace dans une échelle de temps inférieure à la milliseconde.



**Figure 3 : Représentation schématique de l'organe de Corti.** Les cellules ciliées internes (CCI) forment une seule rangée le long de l'organe de Corti tandis que les cellules ciliées externes (CCE) se disposent sur trois rangées. (Image adaptée de : *Principles of Neural science, 5<sup>th</sup> edition*).

Les cellules ciliées externes (CCE) sont organisées en trois rangées et donc trois fois plus nombreuses que les internes. Les CCE amplifient les vibrations de la membrane basilaire (Fig.3) et permettent le long de la partition cochléaire, une décomposition très fine des différentes fréquences d'un son complexe, contribuant à la tonotopie active.

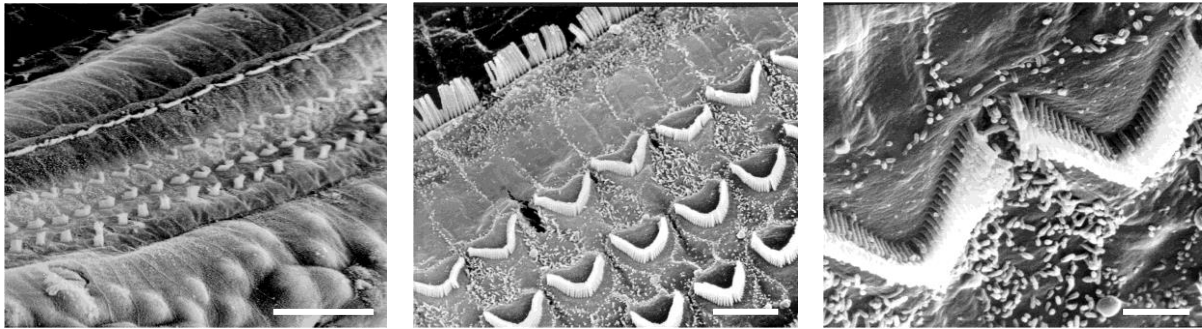
### c) Morphologie et activité des cellules ciliées

#### - Pôle apical des cellules ciliées et mécanotransduction

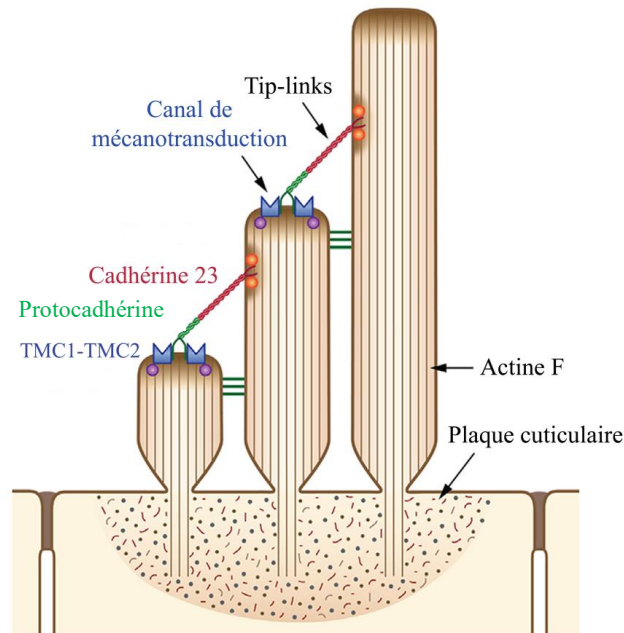
Les cellules sensorielles auditives (CCI et CCE) sont surmontées d'une touffe ciliaire composée de microvillosités rigides : les stéréocils formés d'un réseau dense et hexagonal de filaments d'actine (Fig.4). Chaque cellule possède une petite centaine de stéréocils, formant trois rangées de taille décroissante, la rangée la plus haute étant située du côté de la strie vasculaire. Cette architecture en "marches d'escalier" est conservée chez toutes les cellules ciliées des vertébrés et est essentielle pour une audition normale (Manley et al., 2000). Les stéréocils d'une même rangée mesurent la même taille et sont enracinés dans un réseau dense d'actine transversale formant une structure rigide à l'apex des cellules, la plaque cuticulaire. Les stéréocils des CCI sont implantés de façon linéaire tandis que ceux des CCE forment un "V" (ou "W") (Fig.4A). Les stéréocils sont composés de nombreuses protéines nécessaires à leur mise en place et leur organisation fonctionnelle (Fig.4B) comme :

myosines non conventionnelles telles que les Myo6, 7 et 15; les cadhérines telles que Cdh23 et la protocadhérine 15 (Pcdh15); des protéines d'échafaudage comme les harmonines et des protéines à multiples domaines transmembranaires comme la clarine-1 (voir revue : Koffler et al., 2015).

A.



B.



**Figure 4 : Les stéréocils des cellules ciliées.** A) Vues en microscopie électronique à balayage des stéréocils des CCI (linéaires) et des CCE (en forme de "V"; cochlée de cobaye, images archives du laboratoire). Barres d'échelles de gauche à droite : 50; 5 et 1 µm. B) Les stéréocils, implantés dans la plaque cuticulaire, sont principalement composés d'un réseau hexagonal de filaments d'actine (actine F). Les tip-links (ou liens apicaux) se composent d'homodimères de cadhérine 23 à son extrémité haute et de protocadhérine 15 à son extrémité basse. La protocadhérine 15 interagit avec les canaux de mécanotransduction (MT) *via* ses composants putatifs TMC1 et TMC2 (image adaptée de : Fettiplace, 2016).

L'absence ou la mutation d'une de ces protéines entraîne un mauvais développement ou maintien de la structure fonctionnelle des stéréocils, empêchant les CCE et les CCI d'amplifier et de traduire le signal acoustique. Ces altérations structurelles des stéréocils sont à l'origine du développement de la surdité lors du syndrome de Usher (Liu et al., 1997; Kremer et al., 2006; Fettiplace and Hackney, 2006; Schwander et al., 2010). Le syndrome de Usher est une maladie génétique autosomale récessive qui se caractérise chez l'humain par une surdité bilatérale associée à une déficience visuelle (Reiners et al., 2006). Le syndrome de Usher se classe en trois types cliniques



(USH1 - USH3) selon la sévérité et l'âge d'apparition des symptômes affectant l'audition, la vision et l'équilibre. À ce jour, plus d'une quinzaine de gènes sont connus pour être associés au syndrome de Usher (voir revues : Mathur and Yang., 2015; Koffler et al., 2015).

Des canaux de mécanotransduction (MT) ont été localisés par imagerie calcique à l'extrémité des stéréocils, mais ils sont absents sur la rangée la plus haute (Beurg et al., 2009) (*Fig.4B*). Ils forment de larges pores cationiques non sélectifs avec une grande perméabilité pour le  $K^+$  et le  $Ca^{2+}$  (Ohmori et al., 1985). La déflexion de la touffe ciliaire vers les stéréocils les plus longs, conduit à une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux de MT, alors que les déflexions dans le sens opposé, diminuent cette probabilité d'ouverture (Gillespie and Müller, 2009). De façon remarquable, les canaux de MT peuvent être bloqués par les antibiotiques aminoglycosidiques tels que la kanamycine ou la gentamicine (voir revues : Aran et al., 1999; Dulon et al., 2012). Ces antibiotiques s'accumulent alors sous la plaque cuticulaire des CCE et bloquent la synthèse protéique (ATP) des mitochondries, perturbant la balance énergétique et induisant une ototoxicité et la mort cellulaire (voir revue : Huth et al., 2011).

Des filaments extracellulaires appelés "tip-links", formant des liens apicaux aux extrémités des stéréocils, ont été décrits pour la première fois au niveau des cellules ciliées de cobaye (*Fig.4B*; Pickles et al., 1984). La déflexion des stéréocils augmente ou diminue la tension de ces tip-links qui déclenchent alors l'ouverture ou la fermeture mécanique des canaux de MT, situés à leurs extrémités inférieures. Les tip-links sont essentiellement formés de glycoprotéines transmembranaires d'adhérence de type cadhérines: la cadhérine 23 et la protocadhérine 15 (Ahmed et al., 2006; Kazmierczak et al., 2007). À l'extrémité des tip-links, la protocadhérine 15 peut interagir avec des protéines nommées TMC1 et TMC2 (pour "transmembrane channel-like"). Ces protéines ont été proposées comme étant la base du complexe de la transduction mécano-électrique (Pan et al., 2013; Maeda et al., 2014) suite à la disparition du courant de MT et à la surdité engendrée par la mutation de TMC1 (Vreugde et al., 2002; Kawashima et al., 2011; 2015). Plusieurs différences entre TMC1 et TMC2 suggèrent que ces protéines ont des fonctions distinctes. En effet une étude récente montre que TMC2 est capable de restaurer la fonction vestibulaire en l'absence de TMC1 mais pas la fonction auditive, suggérant que TMC1 fournit une/des fonctions supplémentaires (Asai et al., 2018). Il est à noter que plus de 35 mutations sur TMC1 sont à ce jour répertoriées comme provoquant une perte auditive héréditaire humaine, ce qui en fait l'une des causes de surdité génétique la plus fréquente (Kawashima et al., 2015; Askew et al., 2015). Cependant, le débat est toujours d'actualité concernant la composition exacte des canaux de MT, notamment l'implication ou non de TMC1 et TMC2 comme éléments constitutifs fonctionnels suffisants pour former le canal de MT (voir revue : Fettiplace, 2016). Très récemment, une étude suggère toutefois que TMC1 serait une protéine s'assemblant en dimères, contenant 10 domaines transmembranaires et 4 domaines formant le pore du canal (S4-S7)

(Pan et al., 2018). Il est à noter qu'il existe un gradient tonotopique de TMC1 exprimés sur les stéréocils des cellules ciliées externes, de l'apex vers la base (Beurg et al., 2018).

### - Les cellules ciliées externes (CCE)

Elles ont une forme cylindrique et un diamètre constant (environ 7  $\mu\text{m}$ ) alors que leur hauteur varie en fonction de leur position tonotopique, le long de la cochlée. Par exemple chez le cobaye, une cellule du tour apical (basse fréquence) mesure 75  $\mu\text{m}$  et une cellule au tour basal (haute fréquence) mesure 25  $\mu\text{m}$  (Housley and Ashmore, 1992). Les CCE ont leur noyau situé au pôle basal et contiennent de nombreuses mitochondries le long de leur membrane basolatérale témoignant d'une importante activité métabolique (Hashimoto and Kimura, 1988; Housley and Ashmore, 1992; Dallos, 1992). Cette dernière pourrait être liée à une activité actine/myosine  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante du cytosquelette, contrôlant la tension mécanique membranaire de ces cellules cylindriques (Dulon et al., 1990).

La membrane des CCE est riche en prestine, une protéine ayant des propriétés piézoélectriques responsables de l'électromotilité des cellules à la base de l'amplification des vibrations mécaniques de la membrane basilaire (Zheng et al., 2000; Liberman et al., 2002; Dallos et al., 2008). La prestine (de la notation musicale "presto", rapide) est une protéine transmembranaire, appartenant à la famille de transporteurs d'anions, codée par le gène SLC26A5 ("solute carrier family 26 member 5"). La prestine ne permet pas aux anions de traverser la membrane mais elle joue le rôle de moteur moléculaire (Zheng et al., 2000) de par son changement de conformation lorsqu'elle est soumise à un courant électrique (Brownell, 1985). La sensibilité au voltage et l'électromotilité de la prestine lui sont conférées par ses sites de fixations aux anions chlorures ( $\text{Cl}^-$ ) et bicarbonates ( $\text{HCO}_3^-$ ) (Oliver et al., 2001). Ainsi, au repos, ces anions présents dans le cytoplasme des CCE, sont fixés sur la prestine et une dépolarisation membranaire les libère, déclenchant alors le raccourcissement de la protéine et donc la rétractation des CCE. Cette propriété d'électromotilité des CCE permet la tonotopie active en amplifiant localement la vibration de la membrane basilaire, sans consommer ni  $\text{Ca}^{2+}$ , ni ATP, à une cinétique de l'ordre de quelques microsecondes. L'oscillation des CCE permet alors d'augmenter la sensibilité auditive de 40 à 60 dB et améliore la capacité de coder de façon différentielle des fréquences très proches. Le pouvoir d'amplification et l'activité mécanique active des CCE sont enregistrés par la mesure des produits de distorsion des otoémissions acoustiques (DPOAE) (Kemp, 1978). Méthode rapide et non invasive, la mesure des otoémissions acoustiques est utilisée en routine pour tester l'intégrité de l'appareil auditif, notamment l'activité des CCE lors d'une exploration fonctionnelle en ORL.

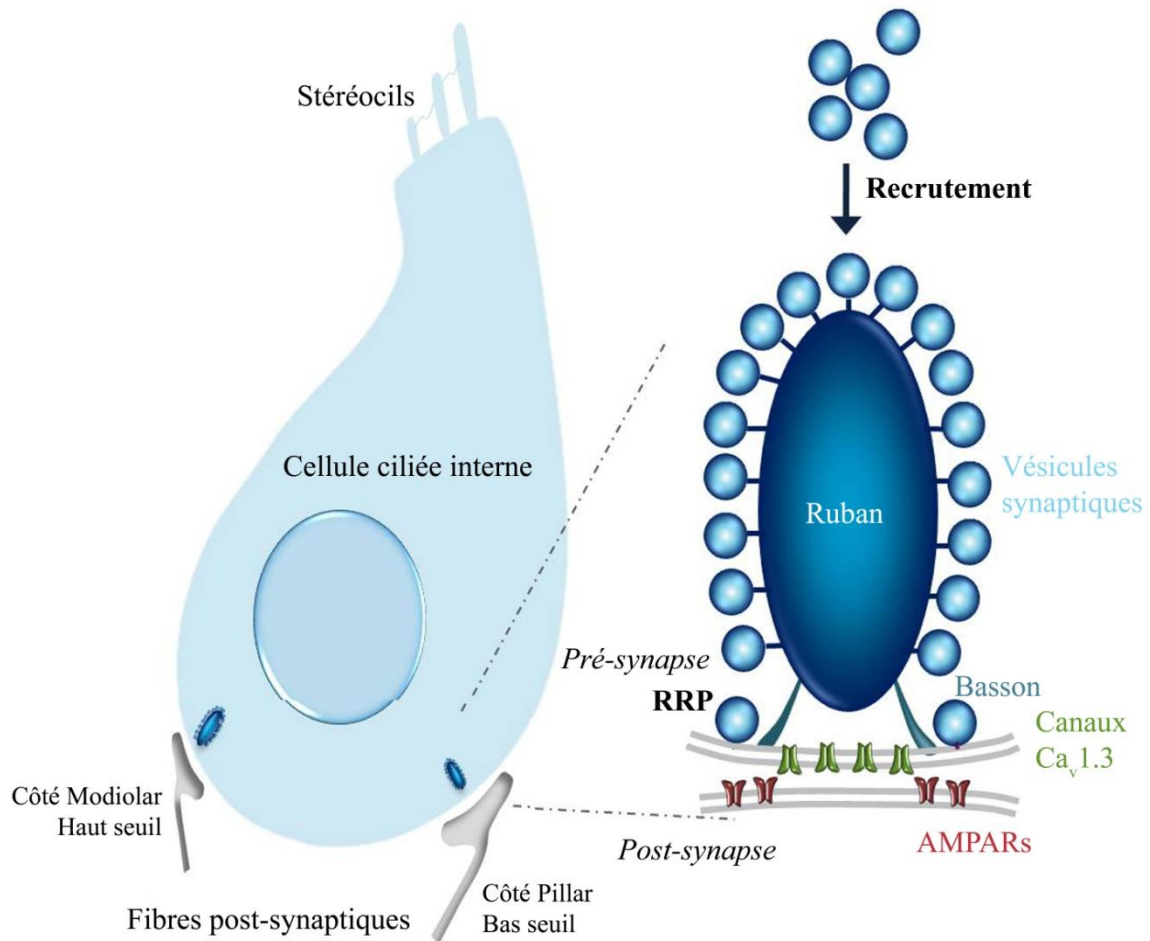
L'électromotilité des CCE est contrôlée par le système efférent médian cholinergique, issu de l'olive médiane supérieure, dont les terminaisons nerveuses contactent directement les CCE et y produisent des courants synaptiques inhibiteurs (Art et al., 1984; Glowatski and Fuchs, 2000). Cette

innervation principalement cholinergique, permet une diminution du gain de l'amplification des CCE et donc d'inhiber les réponses cochléaires. Cette innervation efférente constitue donc une boucle réflexe contrôlant l'amplificateur cochléaire et la sensibilité auditive (Galambos., 1956). Les CCE possèdent des récepteurs cholinergiques nicotiques, en particulier  $\alpha 9$  et  $\alpha 10$ , (Elgoyhen et al., 1994; 2001) qui forment un canal cationique avec une haute perméabilité calcique (Blanchet et al., 1996; Weisstaub et al., 2002). A noter que l'influx calcique dans la région basale des CCE au travers de ces récepteurs nicotiques, entraîne l'activation  $Ca^{2+}$ -dépendante de canaux potassiques SK2, produisant alors une réponse hyperpolarisante inhibitrice (Fuchs and Murrow, 1992; Fuchs, 1996; Dulon et al., 1998).

### - Les cellules ciliées internes (CCI)

Les CCI ont une morphologie piriforme, fine à l'apex et plus large au pôle basal. Entourées de cellules de soutien, elles mesurent environ 30  $\mu m$  de haut pour  $\sim 10 \mu m$  de large et ce de façon constante le long de la partition cochléaire. Au pôle basal des CCI se trouvent les zones actives (ZA) présynaptiques où a lieu l'exocytose des vésicules synaptiques contenant le neurotransmetteur glutamate. Chaque CCI contient entre 10 et 20 ZA, en fonction de l'espèce et de l'organisation tonotopique le long de l'organe de Corti, faisant généralement un pic dans la région correspondant à la gamme fréquentielle la mieux perçue de l'espèce, par exemple entre 16 et 32 kHz chez la souris (Francis et al., 2006; Meyer et al., 2009; voir revue : Meyer and Moser 2010).

Les ZA des cellules ciliées ont la particularité de posséder, attachées au-dessus de la membrane plasmique, des structures denses aux électrons appelées rubans (*Fig.5*). Les rubans synaptiques se composent d'un empilage de protéines ribeye (Schmitz et al., 2000), auquel les vésicules synaptiques viennent s'attacher. La composition protéique des filaments appelés "tethers" par lesquels les vésicules synaptiques s'attachent au ruban est encore inconnue (Vogl et al., 2015; Chakrabarti et al., 2018). Phylogénétiquement, les rubans des cellules sensorielles sont des structures conservées qui sont retrouvées chez les mammifères mais également chez les poissons, amphibiens et oiseaux (Wichmann and Moser, 2015). Chez les vertébrés, les synapses à rubans ne se retrouvent que dans les cellules sensorielles de la cochlée, du vestibule, de la rétine et de la glande pinéale (voir revue : Matthews and Fuchs, 2010). Dans la cochlée, les rubans synaptiques situés au pôle basal des CCI mesurent entre 200 et 400 nm de diamètre. Leur taille et leur forme varient en fonction de l'espèce, du type cellulaire mais également de leur position à la membrane plasmique de la CCI (Liberman 1982a). Ainsi les synapses présentes du côté "pillar" (côté CCE) possèdent des petits rubans faisant face à des fibres afférentes à bas seuil mais présentant une activité spontanée élevée. Les synapses présentes du côté opposé (face "modiolar") ont quant à elles de plus gros rubans en regard de fibres à haut seuil et faible activité spontanée.



**Figure 5 : Représentation schématique de la synapse à ruban des CCI.** Au pôle basal de la CCI se trouvent des structures sphéroïdes lamellaires denses aux électrons appelées rubans. Le ruban est entouré de vésicules synaptiques glutamatergiques. Les vésicules arrimées à la membrane plasmique forment le RRP (pour "readily releasable pool"), groupement de vésicules prêtes à fusionner. Le glutamate libéré dans la fente synaptique est ensuite capté par les récepteurs AMPA, situés sur les fibres post-synaptiques.

Le rôle précis du ruban reste encore mal compris mais différentes hypothèses ont été proposées (Parsons and Sterling, 2003; Wittig and Parsons, 2008; Safieddine et al., 2012; Wichmann and Moser, 2015) :

- Promouvoir un large pool de vésicules amorcées, prêtes à fusionner, appelé le RRP (pour "Readily Releasable Pool") en établissant et/ou stabilisant les sites de fusion vésiculaire (Khimich et al. 2005; Frank et al. 2010)
- Faciliter le ravitaillement vésiculaire à la ZA afin de maintenir le taux important et soutenu d'exocytose (modèle du tapis roulant, Bunt 1971; Gray and Pease 1971; Vollrath and Spiwoкс-Becker 1996; Lenzi and von Gersdorff 2001; Snellman et al. 2011; Parsons and Sterling 2003; Jing et al., 2013)
- Faciliter une fusion multi-vésiculaire (Edmonds 2004; voir revue : Fuchs 2005)
- Servir de barrière de diffusion afin de permettre une haute concentration calcique locale (Graydon et al. 2011). En effet, le ruban et les vésicules définissent un petit volume cytoplasmique proche des

canaux calciques membranaires où la concentration en calcium augmente rapidement pour déclencher la libération synchrone de plusieurs vésicules amorcées.

En début d'année 2018, le rôle des rubans a été décrit sur un modèle murin déficient pour la protéine ribeye, protéine majeure dans la composition des rubans (Becker et al., 2018; Jean et al., 2018). En dépit de la perte totale des rubans, les souris ne présentent qu'un léger déficit auditif. En effet, les synapses des CCI ont conservé leur développement spatio-temporel et l'exocytose des vésicules est réduite mais toujours présente. Les auteurs proposent donc que le ruban ait un rôle dans la facilitation de la transduction du signal en maintenant un pool de vésicules synaptiques plus important (Becker et al., 2018) et également dans la précision temporelle de l'encodage sonore (Jean et al., 2018).

Le phénotype auditif de ce KO-ribeye est peu marqué comparé à celui du modèle murin déficient pour la protéine bassoon. En effet, le ruban est ancré à la membrane plasmique de par son interaction avec cette protéine d'échafaudage bassoon (*Fig.5*) (Dick et al., 2001; Khimich et al., 2005). En l'absence de cette dernière, la majorité des rubans, n'étant plus attachée à la membrane plasmique, "flotte" dans le cytoplasme (Dick et al., 2003; Frank et al., 2010; Jing et al., 2013). Dans ce modèle murin, la transmission synaptique est altérée à la fois dans la fusion vésiculaire et dans le ravitaillement des vésicules à la membrane. La différence de phénotype entre les deux modèles murins peut s'expliquer par le nombre réduit de ZA fonctionnelles lorsque la protéine bassoon est absente alors que de multiples petites ZA, où l'exocytose des vésicules synaptiques est maintenue, peuvent cependant se former en l'absence de ribeye.

Les CCI sont des cellules extrêmement riches en structures membranaires intracellulaires constituant la genèse des vésicules synaptiques ou leurs produits de recyclage. En combinant les techniques de microscopie électronique 3D et la tomographie électronique à haute résolution, l'équipe de Bullen et al., (2015) montre que les CCI peuvent être divisées en deux régions topographiques: un pôle supra-nucléaire contenant la machinerie cellulaire nécessaire à la synthèse protéique *via* l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique et un pôle infra-nucléaire riche en complexes membranaires contenant les rubans synaptiques, un réseau de réticulum endoplasmique, des vésicules et de nombreuses mitochondries. Cette région basale synaptique des CCI semble contenir tous les éléments nécessaires à la production, au recyclage et à l'acheminement des vésicules synaptiques vers leurs sites de fusion.

L'activation de l'exocytose des vésicules synaptique a lieu suite à la déflexion mécanique de la touffe ciliaire au pôle apical des CCI qui entraîne l'ouverture des canaux de mécanotransduction (MT) et l'entrée d'ion  $K^+$  dépolarisant ainsi la CCI. Cette dépolarisation, ou potentiel récepteur, est graduée proportionnellement à l'amplitude du courant de MT. A la base synaptique des CCI, la dépolarisation

augmente la probabilité d'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants de type L, les canaux  $Ca_v1.3$  (voir chapitre 5 : Les canaux calciques). L'augmentation calcique intracellulaire déclenche alors la fusion des vésicules glutamatergiques. Le glutamate libéré dans la fente synaptique est alors capté par les récepteurs glutamatergiques AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid) situés en post-synaptiques, à la membrane des fibres afférentes du nerf auditif (Lieberman et al., 2011). Pour charger leurs vésicules synaptiques en glutamate, les CCI utilisent deux partenaires protéiques : le transporteur glutamatergique 3 (VGLUT-3) et la pompe à protons vésiculaire V-ATPase (Ruel et al., 2008; Obholzer et al., 2008; Seal et al., 2008). La V-ATPase est une enzyme qui crée une différence de concentration entre le milieu intracellulaire et intra-vésiculaire et permet d'acidifier ce dernier. Ce gradient électrochimique est utilisé par VGLUT-3 afin de transporter le glutamate à l'intérieur des vésicules synaptiques (voir revue : Beyenbach and Wieczorek, 2006).

#### d) Innervation afférente et efférente des cellules ciliées

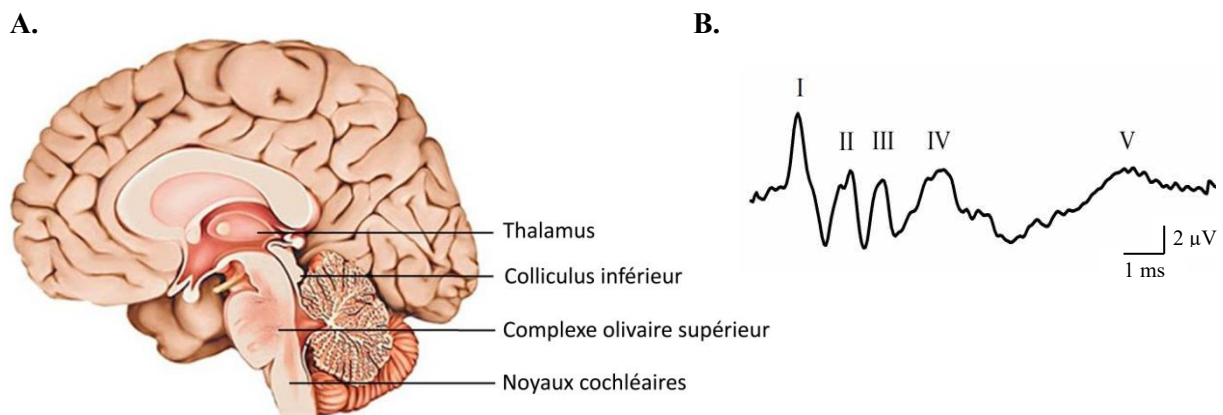
Les fibres afférentes du nerf auditif possèdent sur leur terminaison dendritique (ou bouton synaptique) des regroupements, appelés "clusters", de récepteurs glutamatergiques AMPA. Ce sont des récepteurs ionotropes, perméables au  $Na^+$  et  $K^+$ , composés en particulier des sous-unités GLUR2 et GLUR3. Ces clusters de récepteurs AMPA sont topologiquement disposés en forme d'anneau en face de chaque ruban présynaptique des CCI (Meyer et al., 2009; Lieberman et al., 2011). Il existe un gradient inverse entre la taille des rubans et la taille des clusters de récepteurs AMPA (Lieberman et al., 2011). Ainsi, les gros rubans sont en face de petits clusters de récepteurs AMPA (sur les fibres à haut seuil et à faible activité spontanée) tandis que les petits rubans font face à des clusters de taille plus importante (sur les fibres à bas seuil et à forte activité spontanée).

Il existe deux types de fibres nerveuses afférentes (type I et II). Les fibres de type I constituent 95% des neurones du ganglion spiral (voir revue : Delacroix and Malgrange, 2015). Ces fibres sont myélinisées jusqu'à l'*habenula perforata* où elles traversent la membrane basilaire pour ne contacter qu'une seule CCI à la fois et ainsi former une synapse glutamatergique en face d'un seul ruban présynaptique. Chaque CCI contient entre 15 et 20 synapses afférentes où le rôle principal des fibres est de transmettre le signal encodé par les CCI vers les centres auditifs. En effet, en plus d'innover les cellules ciliées, les neurones bipolaires du ganglion spiral contactent également, via leurs axones, les neurones des noyaux cochléaires situés au niveau du bulbe rachidien, permettant ainsi la transmission de l'information auditive. Les fibres afférentes de type II quant à elles, sont des petites fibres non myélinisées qui constituent uniquement 5% des neurones du ganglion spiral. Elles se ramifient afin d'innover plusieurs dizaines de CCI chacune pour former des synapses glutamatergiques (Weisz et al., 2012). Le rôle de ces fibres afférentes de type II dans l'audition est encore mal compris. Ces fibres seraient capables de répondre aux fortes intensités acoustiques et joueraient ainsi un rôle de signal d'alerte et de douleur acoustique (Brown, 1994; Robertson et al., 1999; Flores et al., 2015).

Les fibres efférentes proviennent des noyaux olivaires supérieurs, localisés au niveau du bulbe rachidien. Les CCE sont contactées par des fibres efférentes issues de l'olive médiane supérieure, formant des synapses cholinergiques inhibitrices comme décrit précédemment. Les fibres issues de l'olive latérale quant à elles, contactent les boutons synaptiques des fibres afférentes de type I qui font synapse avec les CCI. Ces fibres efférentes latérales forment des synapses complexes qui utiliseraient de nombreux types de neurotransmetteurs et neuromodulateurs tels que l'acétylcholine et la dopamine (voir revue : Eybalin, 1993) et réguleraient l'activité de décharges des fibres afférentes de type I (Ruel et al., 2007; Bulankina and Moser, 2012).

### C) La voie auditive centrale

La voie nerveuse auditive centrale passe, après la première synapse entre les CCI et les fibres afférentes, par quatre relais essentiels jusqu'au cortex auditif, ce qui en fait une voie relativement courte et rapide. Les différents relais, après la synapse des CCI, se situent au niveau des noyaux cochléaires, du complexe olivaire supérieur, du colliculus inférieur et du thalamus (*Fig.6A*). L'activité de ces relais synaptiques peut être mesurée *via* leur activité électrique par la technique des ABR (pour "Auditory Brainstem Response" ou Potentiels Évoqués Auditifs) permettant de déterminer quel relais est affecté (*Fig.6B*).



**Figure 6 : Les différents relais de la voie auditive. A)** Schéma d'une coupe sagittale de l'encéphale humain où sont situés les relais synaptiques de la voie auditive. **B)** Exemple d'activité électrique des différents relais synaptiques (technique des ABR) : I = synapse à ruban des CCI; II = Noyaux Cochléaires; III = Complexe Olivaire Supérieur; IV = Colliculus inférieur; V = Thalamus.

### a) Les noyaux cochléaires

Les noyaux cochléaires, constituant le premier relais de la voie nerveuse auditive, se situent au niveau du tronc cérébral (bulbe rachidien). Ces noyaux reçoivent les axones des neurones bipolaires de type I du ganglion spiral. Dans ces noyaux, la tonotopie fréquentielle cochléaire y est conservée et une analyse très fine des impulsions électriques des fibres du nerf auditif y est réalisée afin de décoder les propriétés du message acoustique : intensité, fréquence et durée.

### b) Le complexe olivaire supérieur

Il constitue le deuxième relais majeur au niveau du tronc cérébral en recevant les projections nerveuses croisées issues des neurones du noyau cochléaire controlatéral (les fibres croisent la ligne médiane du bulbe rachidien). Il se compose de plusieurs noyaux, où la tonotopie des noyaux cochléaires est conservée et forme un réseau neuronal intense avec de nombreuses projections ascendantes et descendantes, permettant un rétrocontrôle sur les cellules ciliées. Il est le premier relais où convergent les informations binaurales des deux cochlées et constitue le premier niveau où se produit une interférence dichotique nécessaire à la localisation spatiale des sources sonores (Spitzer and Semple, 1995).

Si l'intensité d'un son, d'un bruit, devient trop importante, des dommages parfois irréversibles peuvent avoir lieu dans la cochlée. Le système auditif possède donc des circuits réflexes de protection impliquant les neurones cholinergiques de l'olive médiane contactant les CCE et les neurones de l'olive latérale se projetant sur les boutons afférents synaptiques contactant les CCI. D'autres noyaux moteurs du tronc cérébral sont contactés par le complexe de l'olive supérieure, permettant la régulation musculaire de la mécanique de la chaîne tympano-ossiculaire (réflexe ossiculaire ou stapédien) afin de diminuer le signal transmis à la cochlée. Cependant, la protection cochléaire par ce réflexe stapédien devient peu efficace lors de stimulations acoustiques de longues durées, lors de fréquences trop élevées (> 1 kHz) ou lors d'un bruit impulsif.

### c) Le colliculus inférieur

Le colliculus inférieur reçoit les basses fréquences de l'oreille ipsilatérale et les hautes fréquences de l'oreille controlatérale. Il joue donc un rôle important dans la localisation spatiale et dans la perception des sources sonores en mouvement et mais serait également impliqué dans l'analyse complexe du langage. De plus, en lien avec le colliculus supérieur, il intervient dans la représentation visuo-auditive de l'espace.



#### d) Le thalamus (corps géniculé médian)

Le corps géniculé médian est le noyau principal du thalamus auditif, dont les neurones projettent vers le cortex auditif. Environ 90% de ces neurones ont un mode de fonctionnement binaural, avec des interactions interaurales complexes telles que la sommation, l'inhibition et l'occlusion. Ces neurones codent les différences de délai et d'intensité interauraux; des fréquences précises ou des variations de fréquence ou d'intensité. Ces différentes propriétés illustrent son rôle prépondérant dans le traitement des sons complexes (voir revue : Galaburda, 1986; Bartlett., 2013). L'information auditive est ensuite traitée par le cortex auditif qui représente ~ 8% de la surface du cortex et se situe dans la partie supérieure du lobe temporal.

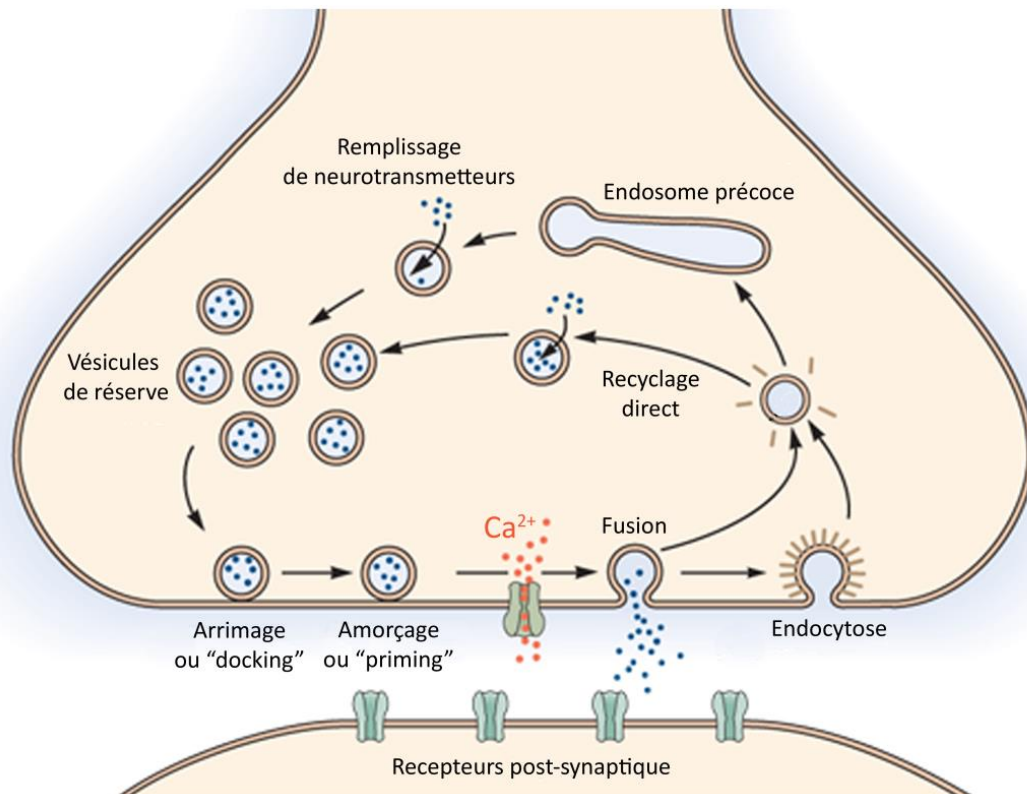
### **D) Surdités**

La surdité désigne la perte partielle ou totale de l'acuité auditive. Cette déficience auditive concerne 5% de la population mondiale et cinq millions de personnes en France (source: Organisation mondiale de la santé: [www.who.int/fr](http://www.who.int/fr)). À noter qu'environ 200 enfants naissent sourds chaque année en France.

Il existe certaines surdités centrales, impliquant le cerveau, mais la grande majorité est liée à une dysfonction de l'oreille. Les surdités de transmission sont liées à une atteinte de l'oreille externe ou moyenne (otite, lésion des osselets...), le déficit est généralement modéré et facilement traité. Les surdités liées au dysfonctionnement de l'oreille interne sont appelées surdités neurosensorielles et sont dues à des lésions des cellules ciliées ou du nerf auditif. L'âge d'apparition de la surdité est très important puisque les répercussions seront différentes, si par exemple, elle apparaît avant ou après l'acquisition du langage chez l'enfant. La surdité précoce nécessite une prise en charge éducative offrant à l'enfant des moyens de communication lui permettant d'étendre ses relations sociales, son développement émotionnel, cognitif et intellectuel. Une surdité peut être d'origine génétique (plus de 300 gènes ont été associés à une perte auditive héréditaire) ou acquise au cours de la vie par un traumatisme acoustique, une infection, le vieillissement, etc. Il est important de rappeler que les cellules ciliées auditives sont incapables de se diviser et de se renouveler, il est donc nécessaire de les préserver car leur détérioration est permanente. Il est à noter qu'en France, deux millions de personnes sont exposées dans leur profession à des niveaux de bruit souvent dangereux pour l'audition (travaux, aéroports...)

## Chapitre 2 : Le cycle vésiculaire des synapses centrales

La communication synaptique neurochimique dépend d'une libération contrôlée de neurotransmetteurs dans la fente synaptique suite à la fusion de vésicules synaptiques arrimées au niveau des zones actives (ZA) présynaptiques. La genèse et le renouvellement de ces vésicules synaptiques dans les ZA constituent le cycle vésiculaire, un élément essentiel de la fidélité et de la précision de la transmission synaptique (Südhof 1995; Südhof 2004). Chargées de neurotransmetteurs, les vésicules synaptiques sont acheminées aux sites de fusion où elles seront arrimées ("docking") à la membrane plasmique (Fig.7). Puis, l'amorçage ("priming") des vésicules leur permet de devenir compétentes à leur exocytose calcique dépendante. Après fusion, différentes voies d'endocytose permettent de reformer les pools de vésicules et d'empêcher l'expansion de la membrane plasmique présynaptique.

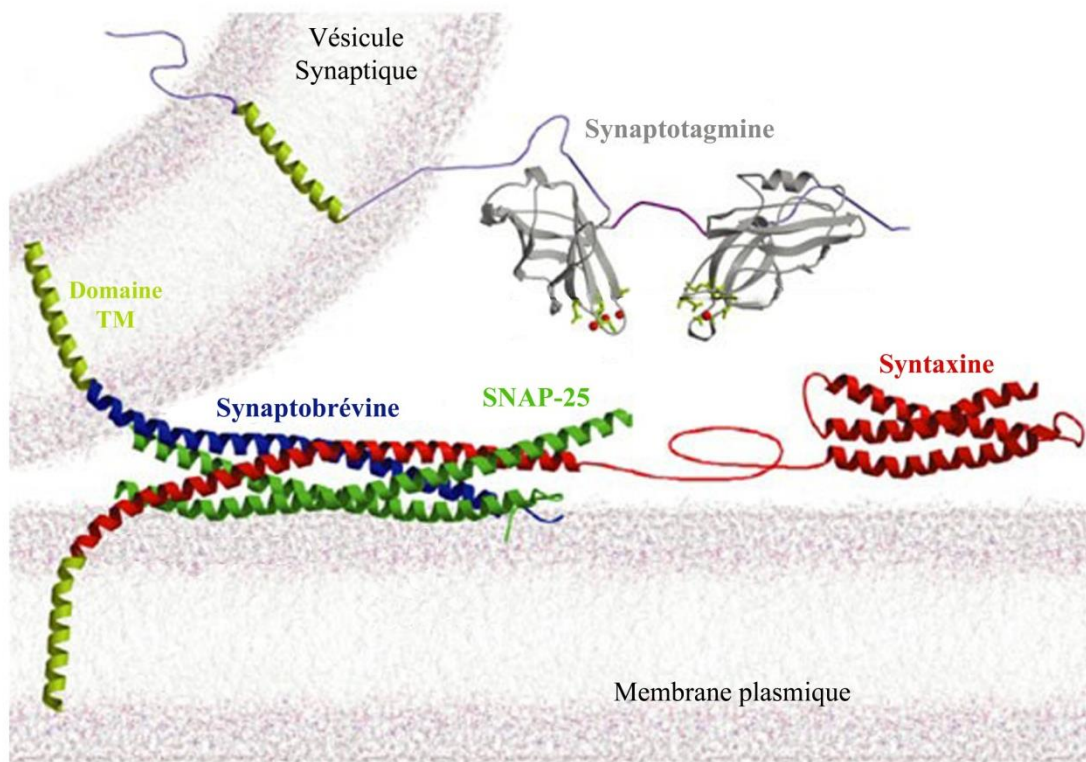


**Figure 7 : Représentation schématique du cycle vésiculaire des synapses du système nerveux central.** Après avoir été chargées en neurotransmetteurs, les vésicules synaptiques sont arrimées, puis amorcées à la membrane plasmique. Suite à l'influx calcique, les vésicules fusionnent puis sont recyclées par différentes voies d'endocytose. (Image adaptée de : *Principles of Neural science*, 5<sup>th</sup> edition).

## A) Exocytose

### a) Les protéines SNAREs :

La fusion vésiculaire fait généralement intervenir des protéines spécifiques d'attachement membranaire telles que les protéines SNAREs ("Soluble NSF Attachment protein Receptor") et des facteurs d'amorçage de la famille de Munc13 ("mammalian uncoordinated 13"). Les protéines SNAREs se caractérisent par la présence de motifs qui ont une grande propension à former des super-hélices  $\alpha$  (ou "coiled-coils") (Südhof and Rothman, 2009). A la synapse, les protéines SNARE vésiculaires (v-SNAREs) synaptobrévines 1 et 2 (ou VAMP pour "vesicle-associated membrane protein") forment un complexe avec les SNAREs de la membrane plasmique, les t-SNAREs, Syntaxine-1 et SNAP-25 (pour "synaptosome-associated protein") (Söllner et al., 1993a) (Fig.8). Ce complexe SNARE forme la structure minimale requise pour amener la membrane des vésicules synaptiques en proche apposition pour la fusion avec la membrane plasmique. Après la fusion, le complexe SNARE est désassemblé par une ATPase, la NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor) et ainsi permettre de les recycler pour une autre fusion (Banerjee et al., 1996; Mayer et al., 1996).



**Figure 8 : Les protéines SNAREs.** Les protéines SNAREs de la membrane plasmique sont la SNAP-25 et la syntaxine; les protéines SNAREs vésiculaires sont les synaptobrévines et le senseur calcique est la synaptotagmine (Image adaptée de : Littleton et al., 2001).

**b) Les senseurs calciques : les synaptotagmines**

Les synaptotagmines sont des protéines vésiculaires impliquées dans la transmission synaptique dépendante du calcium (Littleton et al., 1993). Il existe seize synaptotagmines dans le cerveau (Syt1-Syt16), huit d'entre elles lient le  $\text{Ca}^{2+}$  mais seules Syt1, Syt2 et Syt9 sont exprimées dans la membrane des vésicules présynaptiques (Hudson and Birnbaum, 1995). Les Syt possèdent deux domaines C2 (C2-A et C2-B), qui lient le  $\text{Ca}^{2+}$  et les phospholipides, et un domaine transmembranaire (TM) situé en N-terminal. Les domaines C2-A et C2-B lient respectivement 3 et 2 ions  $\text{Ca}^{2+}$ , *via* cinq résidus aspartates localisés dans les boucles supérieures des domaines C2 (Sutton et al., 1995; Ubach et al., 1998; Shao et al., 1998; Fernandez et al., 2001). Syt1 est la synaptotagmine la plus étudiée puisqu'elle joue le rôle de senseur calcique pour la composante rapide de l'exocytose calcium-dépendante au niveau des synapses centrales (Chapman, 2008; Fernandez-Chacon et al., 2001; Geppert et al., 1994). Syt1 peut se lier aux phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P2) *via* son domaine C2-B de façon indépendante au calcium (Bai et al., 2004; Li et al., 2006; Ramakrishnan et al., 2009). Le domaine C2-B de Syt1 peut également se lier à SNAP-25 et à la syntaxine-1A ce qui permettrait à la synaptotagmine de déclencher l'exocytose en réponse au  $\text{Ca}^{2+}$  (Brewer et al., 2015; Zhou et al., 2015; de Wit et al., 2009; Mohrmann et al., 2013).

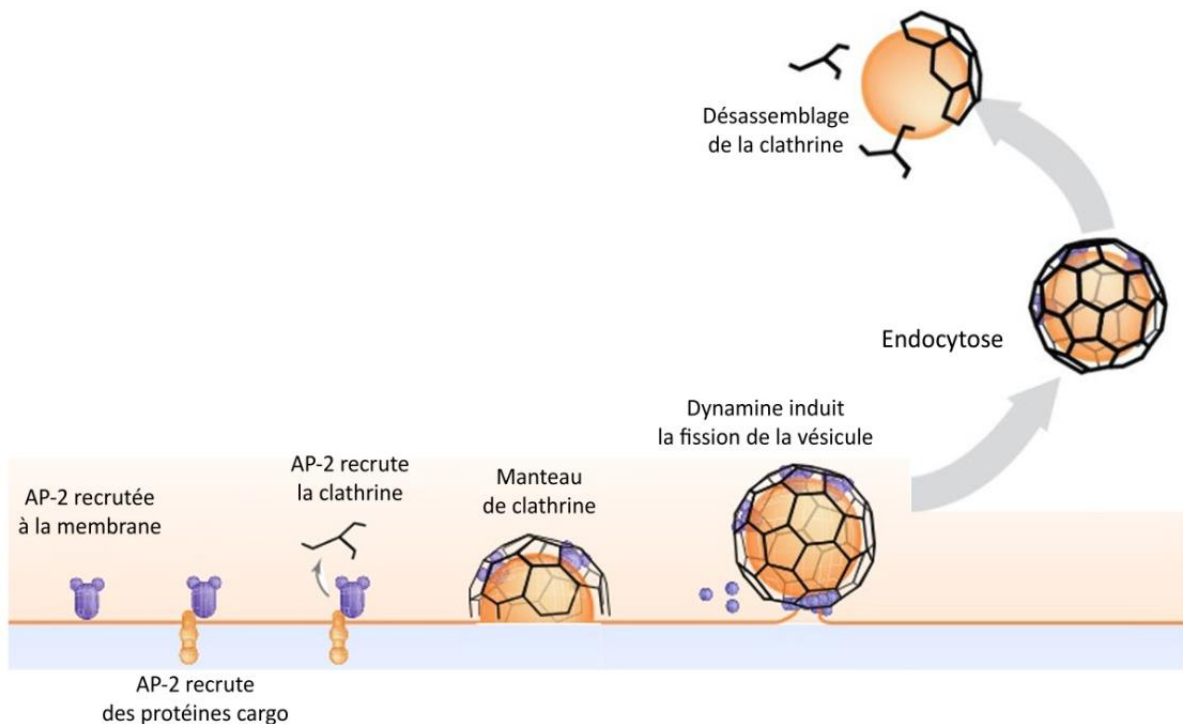
**B) Endocytose**

Afin de prévenir l'expansion de la membrane plasmique présynaptique et pour soutenir la transmission synaptique, l'exocytose des vésicules est suivie par la récupération compensatoire des membranes vésiculaires et la reformation des vésicules (Soykan et al., 2017). Plusieurs voies d'endocytose ont été décrites.

**a) Endocytose clathrine-dépendante**

Le mécanisme majeur d'endocytose est celui dépendant de la clathrine, nommé CME (pour "clathrin-mediated endocytosis") (Heuser and Reesze, 1973; Takei et al., 1996). Dans ce cas, bien que très proches temporellement, les phénomènes d'exo- et d'endocytose sont séparés spatialement: la vésicule fusionne totalement dans la membrane plasmique et les protéines et lipides vésiculaires sont endocytées en dehors de la ZA. Les complexes adaptateurs comme la protéine adaptatrice AP-2 (adaptor protein-2) sont alors recrutés sur la membrane plasmique et permettent sa déformation et son invagination en se liant à la clathrine (*Fig.9*). Cette protéine en forme de triskèle, se polymérise en cage d'hexagones et forme un manteau de clathrine recouvrant la vésicule (McMahon et al., 2011). Le détachement des vésicules de clathrine de la membrane plasmique requiert l'action de la dynamine, une mécano-enzyme qui induit la fission de la base de la vésicule (Marks et al., 2001). Cette protéine

est une GTPase, découverte en 1989 (Shpetner and Vallee, 1989), ayant la propriété de s'assembler en un polymère contractile et de s'enrouler en spirale autour du cou de la vésicule, induisant sa constriction et sa scission suite à l'hydrolyse du GTP (Hinshaw and Schmid 1995; voir revue : Antony et al., 2016). Le désassemblage du manteau de clathrine de la vésicule nouvellement formée est assuré par une ATPase. Cette voie CME est considérée comme lente, ayant une constante de temps d'environ 10-20 sec, pouvant aller jusqu'à 50 sec (Moser and Beutner, 2000; Smith et al., 2008)



**Figure 9 : Endocytose médiée par la clathrine (CME).** La protéine adaptatrice AP-2 permet le recrutement de la clathrine qui forme un manteau autour de la vésicule d'endocytose en formation. La dynamine permet la scission entre la vésicule et la membrane plasmique. (Image adaptée de : *Eric Jorgensen course - 2015*).

#### b) Endocytoses clathrine-indépendantes

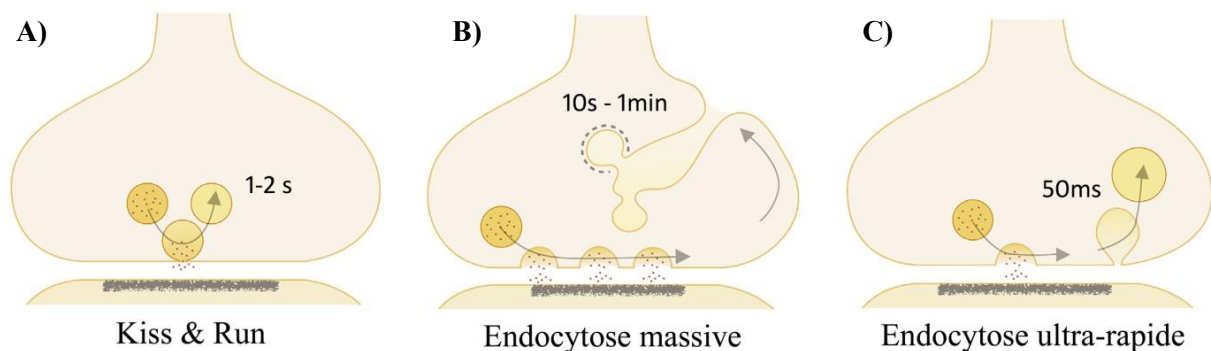
Il en existe plusieurs décrites dans les synapses du SNC :

- Le scénario le plus simple est celui nommé "kiss-and-run" où les vésicules subissent un mécanisme d'exo-endocytose à la zone active suite à leur fusion transitoire et incomplète avec la membrane plasmique (*Fig.10A*). Les vésicules forment un pore étroit, juste assez large pour libérer les neurotransmetteurs puis les vésicules se décrochent de la membrane plasmique, le tout dans une dynamique temporelle assez lente d'une à deux secondes (Fesce et al., 1994; voir revue : Watanabe and Boucrot, 2017).

- La voie d'endocytose massive ("Bulk endocytosis"), aurait lieu suite à une fusion de nombreuses vésicules dans un court intervalle de temps (*Fig.10B*). L'excès de membrane plasmique

serait alors capturé par la formation de grosses invaginations donnant ensuite des vacuoles ou citernes intracellulaires (Heuser and Reesze, 1973; Miller and Heuser 1984; Holt et al., 2003; Hayashi et al., 2008). Le mécanisme moléculaire de cette voie d'endocytose est encore inconnu mais le mécanisme de fission par exemple apparaît comme étant dynamine-indépendant (Hayashi et al., 2008). Cette voie d'endocytose massive prendrait plusieurs dizaines de secondes au niveau des synapses centrales (voir revue : Watanabe and Boucrot, 2017).

- Une étude sur les synapses de l'hippocampe de souris (Watanabe et al., 2013b; Watanabe 2014), basée sur une stimulation optogénétique couplée à la cryofixation ultra-rapide des tissus ("flash and freeze"), montre que les vésicules synaptiques peuvent également être recyclées via une endocytose ultra-rapide, entre 30 et 50 ms, de façon clathrine-indépendante mais dépendante de la dynamine et de l'actine-F (*Fig.10C*).



**Figure 10 : Exocytoses clathrine-indépendantes.** **A)** L'exocytose nommée "kiss-and-run" se caractérise par un pore de fusion s'ouvrant et se fermant transitoirement à la zone active. **B)** Suite à d'intenses stimulations, l'endocytose massive forme d'importantes invaginations à un site plus éloigné. **C)** L'endocytose ultra-rapide a lieu en dehors de la zone active, reformant des vésicules un peu plus larges que celles venant de fusionner. (Figure adaptée de : Watanabe et Boucrot, 2017).

## Chapitre 3 : Le cycle vésiculaire des cellules ciliées internes (CCI)

### A) Exocytose

Comme vu précédemment, les synapses des cellules ciliées internes (CCI) constituent la partie présynaptique de la première synapse du système nerveux auditif, dans la cochlée. Contrairement aux synapses nerveuses centrales, la fusion vésiculaire et la libération de neurotransmetteurs des CCI sont contrôlées non pas par un potentiel d'action, mais par un potentiel récepteur graduel très fin, proportionnel à l'intensité du stimulus acoustique. De façon remarquable, les ZA des CCI sont capables d'atteindre des vitesses d'exocytose extrêmement élevées, de plusieurs centaines de vésicules par millisecondes, d'adapter cette vitesse avec une haute précision temporelle et de la soutenir, sans phénomène de fatigue ou de dépression, en réponse à des stimulations acoustiques soutenues (Moser and Beutner 2000, Johnson et al. 2005, Dulon et al. 2009, Beurg et al. 2010, Schnee et al. 2011; voir revue : Fettiplace 2017). Ces propriétés exceptionnelles suggèrent des mécanismes non-conventionnels de fusions vésiculaires synaptiques au niveau des CCI.

#### a) Les protéines SNAREs

L'expression des t-SNARE (syntaxine 1 et SNAP-25) ainsi que de la v-SNARE synaptobrevine, a été retrouvée dans l'organe de Corti par technique de PCR, d'hybridation *in situ*, de Western blot et d'immunohistochimie (Safieddine et Wenthold 1999). Cependant, une étude de Nouvian et al. (2011) démontre que l'exocytose des CCI est insensible aux neurotoxines botuliques qui causent l'ablation de ces SNAREs. De plus, cette étude ne détecte pas le marquage des v- et t-SNAREs par immunofluorescence et conclut que d'autres protéines que les SNAREs neuronales doivent être présentes à la synapse des CCI pour permettre l'exocytose. Pourtant, plus récemment, les travaux de Scheffer et al., 2015, publiés dans le SHIELD (pour "Shared Harvard Inner-Ear-Laboratory-Database"; <https://shield.hms.harvard.edu/>), montre l'expression durant le développement des SNAREs neuronales dans les CCI. L'implication des SNAREs dans l'exocytose des CCI reste encore aujourd'hui une question en suspens. De plus, les facteurs d'amorçage de Munc13 présents dans les synapses centrales ne sont pas essentiels à l'exocytose et au ravitaillement vésiculaire des synapses des CCI (Vogl et al., 2015).

#### b) Absence des synaptotagmines

Les deux principaux senseurs calciques impliqués dans l'exocytose rapide des synapses du SNC, les synaptotagmines 1 et 2, ne sont pas détectés dans les CCI matures (Safieddine et Wenthold

1997; Beurq et al., 2010). Bien que la Syt1 soit exprimée dans les CCI aux stades immatures, ce senseur calcique ne semble pas réguler l'exocytose des CCI matures, ou adultes (Beurq et al., 2010). De plus, les modèles de souris KO-Syt ne voient pas leur audition affectée. Ces résultats suggèrent donc que l'exocytose  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante dans les cellules ciliées n'est pas médiée par les synaptotagmines. C'est la protéine otoferline qui joue ce rôle de senseur calcique dans les CCI (voir chapitre suivant "Otoferline"). Il est à noter que l'expression de Syt1 dans les souris *Otof*<sup>-/-</sup> ne restaure pas le phénotype auditif et le défaut d'exocytose, soulignant la distinction entre les deux protéines (Resinger et al., 2011).

### c) Fusion multi-vésiculaire ou univésiculaire ?

Dans un grand nombre de synapses du SNC (hippocampe, cervelet, hypothalamus, synapses sensorielles, etc.), la libération des neurotransmetteurs a lieu par fusion multi-vésiculaire, une fusion simultanée de plusieurs vésicules par ZA (voir revue : Rudolph et al., 2015). Ce mécanisme de fusion multi-vésiculaire apparaît également au niveau des synapses des CCI comme indiqué par le décalage temporel des réponses post-synaptiques excitatrices (EPSC pour "excitatory post-synaptic currents") au niveau des boutons des fibres afférentes (Glowatzki and Fuchs, 2002; Goutman and Glowatzki, 2007; Grant et al., 2010; Goutman, 2012). De larges EPSC monophasiques reflètent la fusion synchrone de plusieurs vésicules tandis que les EPSC multiphasiques traduisent une certaine désynchronisation de la fusion. Une exocytose multi-vésiculaire permettrait aux synapses à ruban d'encoder efficacement, en impulsions nerveuses, la composante temporelle et graduelle du signal sonore.

Une étude propose cependant un second type de fusion qui serait univésiculaire, correspondant à la libération d'une seule vésicule par zone active (Chapochnikov et al. 2014). Le pore de fusion de la vésicule varierait de façon dynamique en fonction des stimuli, ce qui permettrait d'expliquer la variation entre les différents EPSC des synapses à ruban. Les auteurs argumentent qu'une libération univésiculaire combinée à une détection post-synaptique sensible serait capable d'une transmission efficace au niveau des synapses des CCI. La coexistence de ces deux types de fusion pourrait également avoir lieu en fonction du niveau de dépolarisation cellulaire.

## **B) Endocytose**

L'exocytose particulièrement rapide et continue des vésicules synaptiques des CCI requiert une compensation toute aussi rapide voire plus rapide afin d'éviter la dépression du pool vésiculaire. La régulation moléculaire de l'endocytose est encore peu connue, mais plusieurs voies possibles ont été étudiées et suggérées (Boumil et al., 2010).



a) Acteurs

La présence de vésicules couvertes d'un manteau de clathrine a été mise en évidence proche des rubans synaptiques (Siegel and Brownell, 1986). Des études ont également montré l'importance de la clathrine dans les CCI matures *via* un inhibiteur de clathrine (Neef et al., 2014). La protéine adaptatrice AP-2 a été montrée comme étant nécessaire à cette voie d'endocytose dépendante de la clathrine dans les CCI (Jung et al., 2015). La protéine AP-2 interagirait également avec l'otoferline, le senseur calcique présumé des CCI (Duncker et al., 2013) (voir chapitre 4: Otoferline). Un modèle de souris portant une mutation non-sens qui interfère dans la dimérisation de la dynamine-1, montre un défaut auditif (Boumil et al., 2010), suggérant l'implication de la dynamine dans les synapses à rubans des CCI.

b) Différentes voies

Différentes voies d'endocytoses semblent coexister dans les synapses des CCI, présentant différentes cinétiques. Une voie endocytotique lente, entre 10 et 50 s (Moser and Beutner, 2000; Beutner et al., 2001; Smith et al., 2008; Cho et al., 2011) serait celle dépendante de la clathrine. Cependant, lorsque les stimulations sont prolongées, l'exocytose est plus importante et les CCI auraient recours à une endocytose massive (ou "Bulk endocytosis"; Neef et al. 2014; Vincent et al., 2014; Michalski et al., 2017). L'existence de cette voie d'endocytose est appuyée par la présence de larges invaginations à proximité des zones actives des cellules ciliées (Lenzi et al., 2002; Neef et al., 2014; Revelo et al., 2014). Cependant ces modes d'endocytose ne semblent pas pouvoir être suffisants pour contrebalancer le taux particulièrement élevé d'exocytose qui a lieu dans les synapses des CCI.

► Questions abordées durant la thèse :

↳ Comment les CCI arrivent-elles à maintenir une homéostasie membranaire avec des vitesses d'exocytoses vésiculaires aussi élevées ? Les CCI sont-elles capables de réaliser une endocytose ultra-rapide similaire à celle retrouvée dans les synapses de l'hippocampe ?

## Chapitre 4: Otoferline

### A) Mutations et Surdité

Des mutations sur le gène OTOF codant pour la protéine otoferline ont été identifiées comme responsables d'une surdité auditive récessive non-syndromique chez l'Homme en 1999 (Yasunaga et al., 1999; Yasunaga et al., 2000). Cette surdité pré-linguale nommée DFNB9 (pour "deafness autosomal recessive 9"), représente environ 2% des surdités non syndromiques, où le déficit auditif est le seul signe clinique observé.   ce jour, une soixantaine de mutations conduisant à la surdité DFNB9 ont été recensées dont certaines (cinq mutations identifiées) conduisent à une surdité exacerbée lors de l'élévation de température corporelle durant une fièvre (Varga et al., 2006; Marlin et al., 2010; Matsunaga et al., 2012; Strenzke et al., 2016). Cette surdité est class e dans les neuropathies et plus pr cis ement dans les synaptopathies auditives. En effet, les mutations du gène OTOF entraînent un défaut de transmission synaptique entre les CCI et les fibres nerveuses du nerf auditif, ces dernières restant fonctionnelles et pouvant être stimulées électriquement par un implant cochléaire. Les patients DFNB9 conservent des CCE avec une activité de transduction électromécanique normale, comme indiqué par les mesures des produits de distorsions des otoémissions acoustiques (DPOAE). Un modèle murin de cette surdité, déficient pour l'otoferline (*Otof*<sup>-/-</sup>), a été généré par l'équipe du Dr Christine Petit à l'Institut Pasteur (Roux et al., 2006). Ce modèle a permis de déterminer l'origine du déficit de transmission présynaptique au niveau des CCI qui présentent une exocytose vésiculaire défaillante.

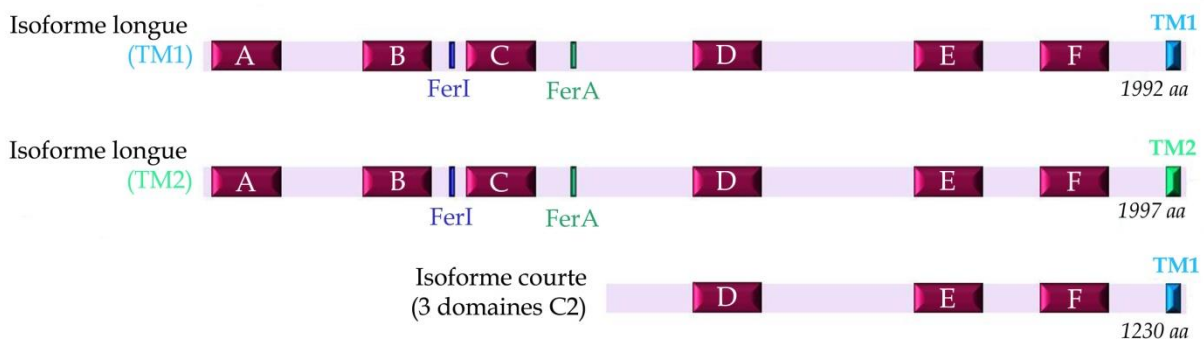
### B) Structure de l'otoferline

#### a) Domaines C2

L'otoferline est une grande protéine de 1997 acides aminés (aa), qui comprend un seul domaine transmembranaire (TM) présent à sa partie C-terminale, ainsi que de six domaines C2 (A-F) pouvant potentiellement lier le Ca<sup>2+</sup> et les phospholipides (*Fig.11*). Les domaines C2 sont des structures composées de huit feuillets-  antiparallèles et de boucles supérieures chargées négativement de par la présence de cinq résidus aspartates, constituant le site de liaison putatif des ions Ca<sup>2+</sup> (Sutton et al., 1995; Xue et al., 2008). Le domaine C2-A est le seul domaine C2 prédit comme étant incapable de lier le Ca<sup>2+</sup> en raison d'une boucle supérieure plus courte, donc du manque d'aspartates coordonnant la liaison calcique (Helfmann et al., 2011).

b) Isoformes de l'otoferline

L'otoferline est exprimée dans de nombreux tissus (foie, reins, cœur, pancréas, muscles squelettiques) mais principalement dans le cerveau, la cochlée et le vestibule (Yasunaga et al., 2000). Deux isoformes ont été identifiées chez l'humain, une longue comprenant les six domaines C2 et le domaine TM (~1997 aa) et une courte exprimant uniquement les trois derniers domaines C2 C-terminal (C2-DEF) et le domaine TM (1230 aa) (Fig.11). L'isoforme longue humaine démontre 98% de similitude de séquence avec l'otoferline murine tandis que l'isoforme courte n'est pas retrouvée chez la souris (Yasunaga et al., 1999; Yasunaga et al., 2000).



**Figure 11 : Représentation schématique des isoformes de l'otoferline.** Les isoformes longues de l'otoferline possèdent six domaines C2 (A-F) et un domaine transmembranaire (TM) en C-terminal. Il existe deux isoformes de ce domaine TM : le TM1 codé par l'exon 48 et le TM2 codé par l'exon 47 lorsque ce dernier ne subit pas d'épissage alternatif. Chez l'humain, une forme courte de l'otoferline a été retrouvée, ne comprenant que les trois derniers domaines C2 C-terminal, les domaines C2-DEF ainsi que le domaine TM1.

L'isoforme longue de l'otoferline est codée par 48 exons, dont les exons 6 et 31 peuvent subir un épissage alternatif dont les conséquences ne sont pas encore connues. L'exon 47, porte également un site d'épissage alternatif et lors de son épissage, l'exon 48 est exprimé et code pour un domaine transmembranaire nommé TM1. Mais lorsque l'exon 47 est présent dans la séquence codante, il code pour un domaine TM2 (Fig.11). Chez l'humain et la souris, il semble que l'isoforme comportant le domaine TM2 (exon 47) soit la forme retrouvée dans le cerveau et l'isoforme ayant le domaine TM1 (exon 48) dans la cochlée (Yasunaga et al., 2000; Choi et al., 2009). Il est également à noter que ces deux domaines TM ne partagent que 53% de similarité de séquence.

➤ Questions abordées durant la thèse :

↳ L'isoforme courte de l'otoferline exprimée chez l'Homme (domaines C2-DEF) a-t-elle un rôle fonctionnel dans la transmission synaptique des cellules ciliées internes ? Cette isoforme pourrait-elle restaurer la fonction auditive ou l'exocytose des cellules ciliées internes chez la souris *Otof*<sup>-/-</sup> ?

### C) Expression et localisation de l'otoferline

Chez la souris, le système auditif n'est fonctionnel qu'après environ 12 jours post-natal (P12). L'otoferline est indispensable à l'activité exocytotique des CCI après l'âge de P4, contrairement aux stades précoces du développement où l'exocytose est otoferline-indépendante (Beurg et al., 2010). L'expression de l'otoferline augmente dans les cellules ciliées durant leur maturité, restant exprimée durablement dans les CCI et uniquement de façon transitoire dans les CCE où elle disparaît vers P6 (Roux et al., 2006; Shug et al., 2006). Cette expression transitoire est cependant essentielle à l'exocytose synaptique spontanée des CCE immatures, participant à la mise en place de la tonotopie fréquentielle des noyaux auditifs centraux au cours du développement (Beurg et al., 2008). A noter que l'otoferline est également essentielle à l'exocytose rapide des cellules vestibulaires de type I (Dulon et al., 2009).

Au niveau des CCI et des cellules vestibulaires, la localisation de l'otoferline a été déterminée par marquage immunogold et retrouvée au niveau des vésicules synaptiques (Roux et al., 2006; Dulon et al., 2009) ou bien par marquage immunohistochimique et retrouvée de façon prédominante dans l'appareil de Golgi et la zone présynaptique (Schug et al., 2006; Heidrych et al., 2008). Une étude récente de Redpath et al. (2015) montre également un marquage à la membrane plasmique et une colocalisation avec certains marqueurs de l'appareil trans-Golgien (GM130 ou TGLON2). De plus, la protéine Rab8, qui jouerait un rôle dans la régulation du trafic le long du réseau trans-Golgien, de la voie du recyclage des endosomes et du transport basolatéral des vésicules vers les sites d'exocytose (Ang et al., 2003; Henry et al., 2008) interagirait avec l'otoferline, suggérant sa possible implication dans le recyclage des endosomes en vésicules synaptiques.

### D) Interactions de l'otoferline

L'otoferline a été montrée comme pouvant interagir avec de nombreux partenaires protéiques, chacune de ses interactions lui suggérant des rôles particuliers (*Tableau 1*). Le domaine C2-A étant le seul des six domaines de l'otoferline ne pouvant pas lier le  $Ca^{2+}$  (Johnson and Chapman, 2010; Helfmann et al., 2011; Padmanarayana et al., 2014), l'idée d'une simple redondance entre chaque domaine C2 est rejetée.

Otoferline	C2-A	C2-B	C2-C	C2-D	C2-E	C2-F	Références
Ca <sup>2+</sup>		✓	✓	✓	✓	✓	Johnson and Chapman, 2010
Syntaxine 1A	✓	✓		✓	✓	✓	Ramakrishnan et al., 2009 Ramakrishnan et al., 2014
SNAP-25						✓	Ramakrishnan et al., 2014
Canaux calciques Ca <sub>v</sub> 1.3	✓	✓		✓		✓	Ramakrishnan et al., 2009 Hams et al., 2017
PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)			✓			✓	Roux et al., 2006; Ramakrishnan et al., 2009; Padmanarayana et al., 2014
Myosine VI				✓			Heidrych et al., 2009
NSF	✓	✓		✓		✓	Selvakumar et al., 2016
AP-2	✓	✓		✓		✓	Selvakumar et al., 2016

**Tableau 1 : Résumé des liaisons ou interactions potentielles de chaque domaine C2 de l'otoferline.**

### E) Rôles de l'otoferline

Un modèle murin où l'otoferline n'est pas exprimée suite à une délétion des exons 14 et 15 du gène OTOF a été généré (Roux et al., 2006). Ces souris déficientes pour l'otoferline (*Otof*<sup>-/-</sup>) présentent une surdité profonde. Les enregistrements en patch-clamp de l'activité électrique des CCI des souris *Otof*<sup>-/-</sup>, démontrent une déficience importante de l'activité exocytotique.

Un autre modèle murin, *pachanga*, portant une mutation faux-sens dans le domaine C2-F de l'otoferline, a été généré par l'équipe de Schwander et al (2007). Les souris *pachanga* montrent une déficience auditive profonde mais contrairement aux souris *Otof*<sup>-/-</sup>, les CCI expriment encore faiblement l'otoferline et maintiennent la fusion rapide du pool de vésicules prêtes à fusionner, formant le RRP (pour "readily releasable pool") (Pangrsic et al., 2012). Cependant, l'exocytose des CCI chez ce mutant ne peut être soutenue lors de stimulations répétées indiquant une altération du recrutement vésiculaire aux sites de fusion des CCI. Ces résultats suggèrent une propriété particulière à l'otoferline,

celle de constituer un senseur calcique essentiel aux mécanismes de réapprovisionnement en vésicules synaptiques des ZA des CCI. Il est à noter que ce recrutement vésiculaire est un mécanisme calcium-dépendant (Spasova et al., 2004; Levic et al., 2011).

L'otoferline paraît jouer le rôle de senseur calcique des CCI sur la base de plusieurs arguments :

- son association aux vésicules synaptiques
- la morphologie normale des rubans et la présence de vésicules arrimées à la membrane plasmique chez les souris *Otof*<sup>-/-</sup>, de façon comparable aux souris WT, suggérant son rôle dans une étape en aval
- son interaction avec les protéines SNARE, les canaux calciques Ca<sub>v</sub>1.3 et les phospholipides
- l'altération de la fusion vésiculaire chez le modèle *Otof*<sup>-/-</sup>
- l'altération du recrutement des vésicules synaptiques chez le modèle *pachanga*
- les autres membres de la famille des ferlines, lorsqu'ils sont défectueux, sont à l'origine d'anomalies de fusion vésiculaire

► Question abordée durant la thèse :

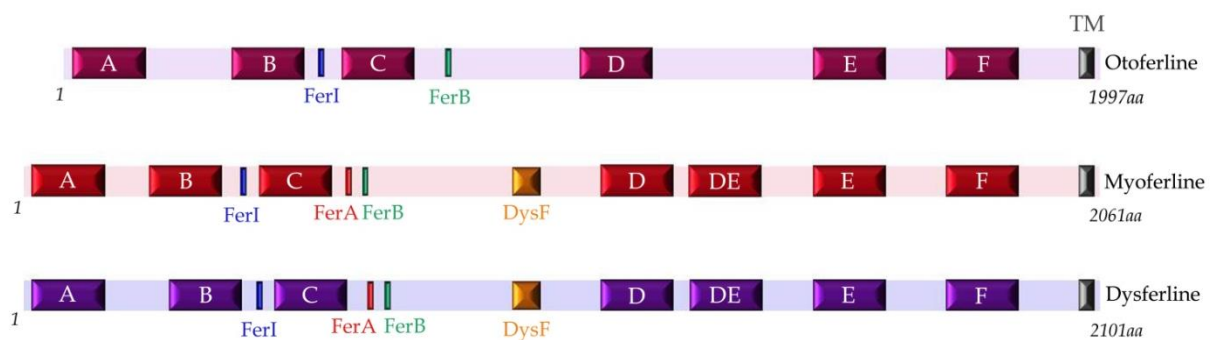
↳ Dans quelles étapes du cycle des vésicules synaptiques des CCI (recrutement, arrimage, amorçage, fusion, endocytose) l'otoferline joue-t-elle le rôle de senseur calcique ?

## F) Ferlines

L'otoferline appartient à la famille protéique des ferlines, composée chez l'humain, de cinq membres en plus de l'otoferline (fer1L2) : la dysferline (fer1L1), la myoferline (fer1L3), fer1L4, fer1L5 et fer1L6 (Lek et al., 2010). La première ferline identifiée a été Fer-1, dans *Caenorhabditis elegans*. Fer-1 est un facteur de fécondation requis pour la fusion de vésicules spécialisées (organelles membranaires) avec la membrane plasmique durant la spermatogénèse (Achanzar and Ward, 1997). Les caractéristiques principales des ferlines sont : la présence de multiples domaines C2 qui partagent une forte similarité de séquence, la présence de domaines "Fer", leur ancrage membranaire par leur domaine C-terminal et leur implication dans les événements de fusion membranaire (McNeil and Kirchhausen, 2005; Jiménez and Bashir, 2007; Lek et al., 2012). Seuls les rôles physiologiques de la dysferline et la myoferline seront discutés dans ce manuscrit.

a) Myoferline :

La myoferline est exprimée de façon ubiquitaire avec une expression plus importante dans les muscles cardiaques et squelettiques et dans le placenta (Davis et al., 2000). La myoferline est impliquée dans la fusion des myoblastes, dans la réparation et la régénération mais aussi dans le développement des membranes des cellules musculaires en général (Doherty et al., 2005). La myoferline contient sept domaines C2 exprimant, contrairement à l'otoferline, le domaine C2-DE, qui se situe entre le domaine C2-D et C2-E (Lek et al., 2010). Un domaine dysferline (DysF), se constituant de deux longs feuillets  $\beta$ , est retrouvé entre les domaines C2-C et C2D et un domaine FerA, constitué de hélices  $\alpha$ , précède le domaine FerB (*Fig.12*). Bien que leurs rôles soient encore inconnus, le domaine FerA semble être présent de façon concomitante avec le domaine DysF dans la famille des Ferlines, suggérant une relation fonctionnelle entre ces deux domaines.



**Figure 12 : Représentation schématique de la structure de l'otoferline, la myoferline et la dysferline.** Ces protéines de la famille des Ferlines sont constituées de domaines C2, des domaines FerI et FerB ainsi que d'un domaine transmembranaire (TM) en C-terminal. Un domaine nommé dysferline (DysF) se situe entre les domaines C2-C et C2-D et un domaine FerA précède le domaine FerB chez la myoferline et la dysferline.

b) Dysferline :

La dysferline est également exprimée de façon ubiquitaire avec une forte expression dans le cerveau, le cœur et les muscles squelettiques (Anderson et al., 1999). De façon similaire à la myoferline, la dysferline se compose de sept domaines C2, du domaine DysF et du domaine FerA précédant le domaine FerB (*Fig.12*). Les mutations répertoriées sur la dysferline entraînent des "dysferlinopathies" incluant des dystrophies musculaires qui se traduisent par déclin physique important (Bashir et al., 1998; Liu et al., 1998). Un modèle murin déficient pour la dysferline révèle son action comme premier régulateur d'urgence de la réparation membranaire de façon calcium-dépendante suite à une lésion membranaire des myofibrilles (Bansal et al., 2003; voir revue : Barthélémy et al., 2018).

Une étude de Lek et al. (2013) démontre que la dysferline peut être clivée par la calpaïne (1 et 2; protéase dépendante du calcium) en réponse à un influx calcique suivant une lésion membranaire. Le clivage de la dysferline par la calpaïne libère un fragment C-terminal de ~72 kDa, appelé "mini-dysferline-C72", comportant les deux derniers domaines C2 en C-terminal (C2-E et C2-F) et le domaine TM. Comme les anticorps dirigés contre la partie N-terminal ne détectent aucune dysferline aux sites de lésions contrairement aux anticorps dirigés contre la partie C-terminal, les auteurs déterminent que la mini-dysferline-C72 est recrutée de façon sélective, où elle aurait un rôle de réparation membranaire (Lek et al., 2013; Redpath et al., 2014).

Il est intéressant de noter que l'expression d'une mini-dysferline, constituée uniquement des deux derniers domaines en C-terminal ainsi que du domaine TM, dans les cellules musculaires *via* l'utilisation d'un vecteur AAV, a permis une réparation efficace des sites de lésions dans un modèle murin de dysferlinopathie (Krahn et al., 2010). Les auteurs suggèrent alors que ce motif à deux domaines C2 constitue une configuration minimale requise pour la fonction physiologique de la dysferline de réparation membranaire

L'otoferline et la myoferline peuvent elles aussi libérer un module comportant les deux derniers domaines C-terminal et le domaine TM en subissant *in vitro* le clivage enzymatique de la calpaïne (Redpath et al., 2014; Piper et al. 2017). Cette structure porte une grande similarité structurale avec la famille des synaptotagmines, comportant elles aussi deux domaines C2 et un domaine TM (*Fig.13*). De plus, ces domaines C2-EF ont été montrés comme pouvant restaurer le phénotype auditif chez le poisson-zèbre déficient pour l'otoferline (Chatterjee et al., 2015). Une étude phylogénétique révèle que ces deux domaines C2 situés en C-terminal sont les plus conservés dans l'évolution concernant la famille des ferlines (Lek et al., 2010). Les domaines C2-EF partagent en effet près de 90% de similarité de séquence entre les mammifères et les mollusques, ce qui suggère à ces domaines une fonction essentielle et préservée.

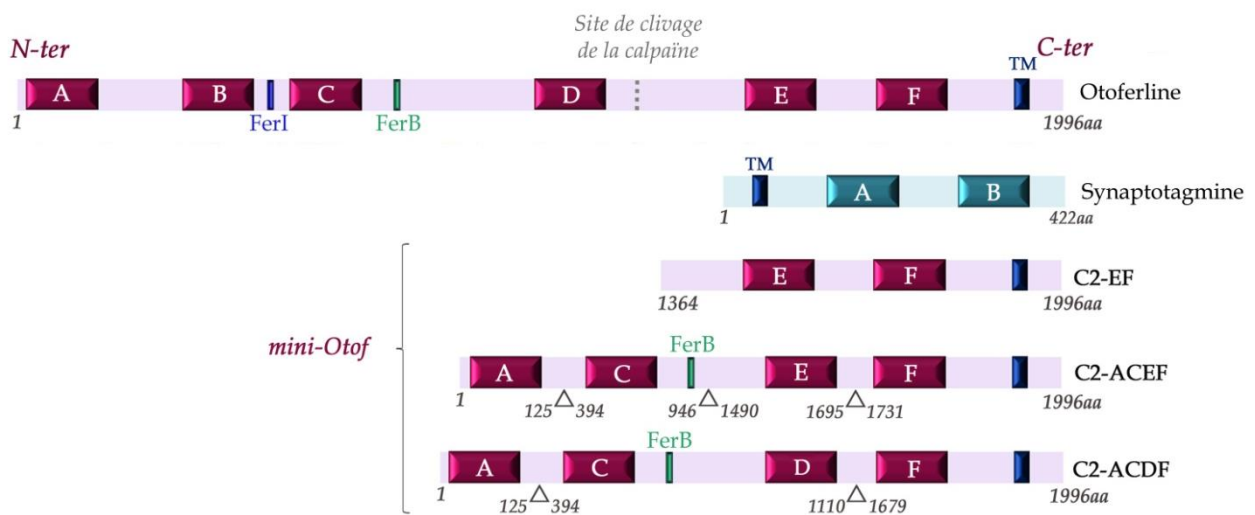
Une étude récente sur la dysferlinopathie de Llanga et al. (2017) a montré une récupération partielle de l'intégrité musculaire suite à une thérapie génique virale permettant la réexpression d'une dysferline réduite dans leur modèle murin déficient pour la dysferline. Cette dysferline raccourcie de 30%, nommée "nano-dysferline" a été construite *in silico* et ne contient que quatre domaines C2 : les domaines C2-A, B, C et G.



➤ Questions abordées durant la thèse :

➔ Une mini-Otof composée uniquement du domaine TM et des deux domaines C2 adjacents (domaines C2-EF), de façon semblable à la mini-dysferline-C72 et aux synaptotagmines, pourrait-elle restaurer la fonction auditive et/ou l'exocytose synaptique au niveau des cellules ciliées internes chez la souris *Otof<sup>-/-</sup>* (Fig.13) ?

➔ Des mini-Otof construites de façon similaire à la nano-dysferline, avec quatre domaines C2 (C2-ACEF et C2-ACDF) pourraient-elles restaurer la fonction auditive et/ou l'exocytose synaptique au niveau des cellules ciliées internes chez la souris *Otof<sup>-/-</sup>* (Fig.13) ?



**Figure 13 : Représentation schématique de l'otoferline, la synaptotagmine et de formes courtes de l'otoferline (mini-Otof).** La synaptotagmine ne contient que deux domaines C2 et son domaine TM est en N-ter. Avec une structure similaire à la synaptotagmine et correspondant au site de clivage putatif par de la calpaïne, la mini-Otof C2-EF ne contient que les deux domaines C2 adjacents au domaine TM. Deux mini-Otof raccourcies de façon similaire à la nano-dysferline, avec uniquement 4 domaines C2 (C2-ACEF et C2-ACDF) ont également été générées.

## Chapitre 5: Les canaux calciques

Les canaux calciques jouent un rôle clef dans la signalisation intracellulaire de nombreux processus physiologiques neuronaux comme l'expression génique, l'excitabilité et la plasticité neuronale ou encore l'exocytose des vésicules synaptiques (Flavell and Greenberg, 2008; Simms and Zamponi, 2014; Striessing et al., 2014). L'activation voltage-dépendante de ces canaux permet une élévation très rapide et focalisée de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, au plus proche des cibles fonctionnelles comme les senseurs calciques ou les vésicules synaptiques. Au niveau des ZA des cellules ciliées de l'oreille interne, ces canaux  $\text{Ca}^{2+}$  sont organisés en clusters dont la disposition topographique confère des propriétés particulières aux synapses cochléaires et vestibulaires (Vincent et al., 2014). Par ailleurs, les travaux de recherche sur de nombreux types cellulaires ont montré que les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  présentent une très grande diversité moléculaire avec une dizaine de sous-unités  $\alpha 1$  canalaire associées aux sous-unités régulatrices  $\alpha 2/\delta$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  dont de nombreux gènes et isoformes sont identifiés (Lory et al., 2006).

### A) Familles et sous-unités des canaux calciques

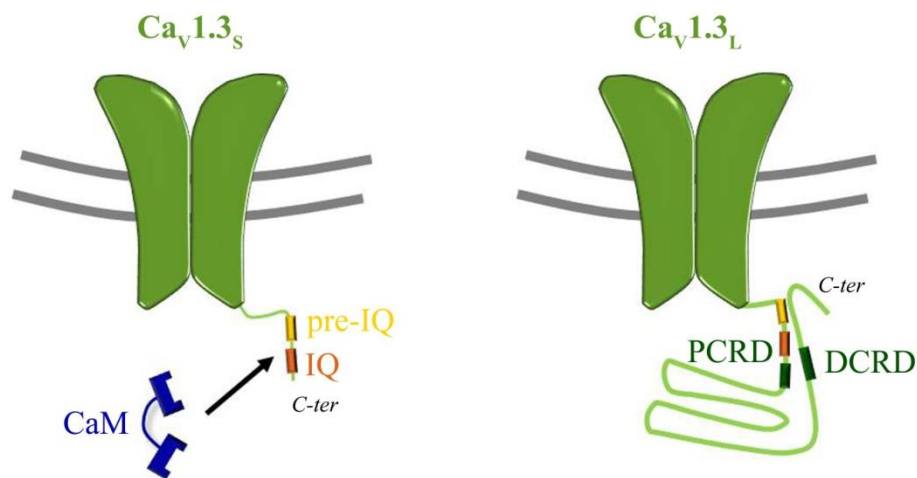
Les canaux calciques voltage-dépendants peuvent être séparés en cinq grandes familles en fonction de leur sensibilité au voltage (familles T, N et L) et à différentes toxines (familles P/Q et R) (Armstrong and Matteson, 1985; Budde et al., 2002; voir revue : Catterall, 2011; Striessnig et al., 2014). Ce sont des protéines hétéro-pentamériques, constituées de cinq sous-unités ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) (Curtis and Catterall, 1984, 1986). La grande diversité des canaux calciques est due aux nombreux gènes codants pour la sous-unité  $\alpha 1$  qui forme le pore du canal. Il existe trois familles de sous-unités  $\alpha 1$  (nommées  $\text{Ca}_v1$ ,  $\text{Ca}_v2$  et  $\text{Ca}_v3$ ) chacune d'elles ayant plusieurs membres (pour un total de 10 isoformes) conférant des propriétés pharmacologiques et électrophysiologiques spécifiques au canal calcique (voir revue : Catterall et al., 2005). La famille des  $\text{Ca}_v1$  code pour quatre canaux de types L ( $\text{Ca}_v1.1$  -  $\text{Ca}_v1.4$ ) qui sont activés à haut seuil (par de fortes dépolarisations), qui présentent une faible inactivation et qui sont sensibles aux agonistes et antagonistes des dihydropyridines (Randall and Tsien, 1995; voir revue : Striessnig, 1999). Le  $\text{Ca}_v1.1$  (excitation-contraction des muscles squelettiques) et le  $\text{Ca}_v1.4$  (signalisation dans la rétine) ont des fonctions très restreintes, tandis que le  $\text{Ca}_v1.2$  et le  $\text{Ca}_v1.3$  sont plus largement exprimés dans l'organisme et peuvent coexister dans une même cellule (Berger and Bartsch, 2014; Striessnig et al., 2014). Au niveau des synapses afférentes des CCI, on retrouve majoritairement les canaux  $\text{Ca}_v1.3$  encodés par le gène *CACNA1D*. Ces canaux  $\text{Ca}_v1.3$  sont essentiels à l'audition car à la base de l'influx calcique intracellulaire déclenchant l'exocytose des vésicules synaptiques des CCI (Kollmar et al. 1997; Platzer et al., 2000; Brandt et al., 2003). Ils sont

également exprimés au niveau du nœud sinusal cardiaque, des cellules musculaires et dans les neurones (Platzer et al., 2000).

## B) Inactivation des canaux calciques $Ca_v1.3$

### a) Inactivation par le $Ca^{2+}$

Afin d'affiner la réponse temporelle du signal physiologique, les canaux calciques voltage-dépendants peuvent s'inactiver en fonction du voltage mais également en fonction de la concentration calcique intracellulaire. Ainsi, les canaux  $Ca_v1.3$  possèdent un mécanisme auto-inhibiteur induit par l'entrée de  $Ca^{2+}$  (nommée CDI pour "calcium dependant inactivation"), qui limite son influx et l'accumulation toxique intracellulaire (Ben-Johny and Yue, 2014). Cette régulation s'effectue par l'action d'une protéine liant le  $Ca^{2+}$ , la calmoduline (CaM), qui interagit avec la partie C-terminale régulatrice de la sous-unité  $\alpha 1$  du canal et induit la CDI (Fig.14) (Xu and Lipscombe, 2000; Shen et al., 2006; Yang et al., 2006).



**Figure 14 : Isoformes de canaux calciques  $Ca_v1.3$ .** Les canaux  $Ca_v1.3_S$  sont rapidement inactivés par la fixation  $Ca^{2+}$ -dépendante de la CaM sur les domaines IQ et pré-IQ de leur partie C-terminale régulatrice. Les canaux  $Ca_v1.3_L$  possèdent deux domaines de régulation, ("proximal and distal C-terminal regulatory domain" : PCRDR et DCRDR) empêchant la fixation de la CaM et diminuant l'inactivation du canal.

Dans de nombreux tissus, les transcrits des canaux  $Ca_v1.3$  peuvent subir un épissage alternatif conduisant à des isoformes protéiques, en particulier dans la partie C-terminale régulatrice, modifiant leur propriété d'inactivation (Bock et al., 2011; Huang et al., 2013). Les synapses des CCI possèdent deux isoformes de canaux  $Ca_v1.3$ , les longs ( $Ca_v1.3_L$ ) et les courts ( $Ca_v1.3_S$ , pour "short") de par l'épissage de l'exon 43 du gène CACNA1D (Scharinger et al., 2015). Les isoformes  $Ca_v1.3_L$ , possédant

la partie C-terminale régulatrice dans son intégralité, présentent deux domaines de régulation, un proximal et un distal (PCRD pour "proximal C-terminal regulatory domain" et DCRD pour "distal C-terminal regulatory domain") (Fig.14). La structure tridimensionnelle de ces domaines rentrerait en compétition avec l'interaction de la CaM avec les domaines IQ et pré-IQ, et diminuerait donc l'inactivation du canal, sa probabilité d'ouverture et sa sensibilité au voltage (Singh et al., 2008; Liu et al., 2010; Bock et al., 2011). Les isoformes  $Ca_v1.3_S$  possèdent eux, une partie C-terminale régulatrice tronquée, où le domaine de régulation DCRD est absent mais où sont conservés les domaines IQ et pré-IQ ce qui confère à ces isoformes, une cinétique d'inactivation plus rapide (Fig.14) (Peterson et al., 1999; Qin et al., 1999; Catterall, 2011; Erickson et al., 2003; Liu et al., 2010; Striessnig et al., 2014). Les canaux calciques  $Ca_v1.3_S$  et  $Ca_v1.3_L$  représentent respectivement 25% et 75% environ du courant calcique total dans les CCI et possèdent respectivement un temps d'inactivation très rapide (échelle de la milliseconde) et lent (échelle de la seconde) (Vincent et al., 2017).

À noter que des protéines structurellement proches de la CaM, les CaBPs (pour "Calcium Binding Protein") sont exprimées dans les CCI (Cui et al, 2007; Uthaiyah and Hudspeth, 2010). Les CaBPs, liant le  $Ca^{2+}$ , peuvent entrer en compétition avec le site de fixation de la CaM et ralentir ou accélérer l'inactivation selon les cinq isoformes répertoriées (Ben Johny et al., 2013; Striessnig et al., 2014; Scharinger et al., 2015).

#### b) Inactivation par les protons ( $H^+$ )

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur des synapses du SNC et des synapses périphériques sensorielles du système auditif et visuel. Ce sont les transporteurs vésiculaires du glutamate, VGLUT-1, -2 ou -3 (ce dernier étant utilisé dans les CCI) qui permettent de charger les vésicules synaptiques en glutamate en utilisant le gradient électrochimique en protons ( $H^+$ ) généré par la pompe à protons vésiculaire V-ATPase. Lors de l'exocytose, les  $H^+$  sont libérés conjointement avec le glutamate dans la fente synaptique, entraînant une acidification extracellulaire locale, proche des sites de fusion et des canaux  $Ca_v1.3$ . Cette acidification entraîne alors une inactivation transitoire du courant calcique. Les ions  $H^+$  extracellulaires peuvent en effet se fixer sur deux ensembles distincts d'aa de la sous-unité  $\alpha$  des  $Ca_v1.3$  : dans le pore du canal, diminuant sa conductance et sur le domaine senseur au voltage, diminuant la probabilité d'ouverture (Zhou and Jones, 1996). Cette inactivation transitoire due aux  $H^+$ , pouvant agir comme rétrocontrôle négatif sur la libération de glutamate, a été mise en évidence au niveau des synapses à ruban des photorécepteurs, des cellules bipolaires et des cellules ciliées auditives des amphibiens et des souris (DeVries 2001; Palmer et al. 2003; Cho and von Gersdorff, 2014; Vincent et al., 2018). Notre équipe a récemment analysé l'amplitude des inactivations transitoires dues aux  $H^+$ , suggérant que chaque ruban de CCI serait capable de déclencher la fusion simultanée de 2 à 9 vésicules; argument supplémentaire pour un mode de fusion multi-vésiculaire dans les CCI (Vincent et al., 2018).

### C) Rôles des canaux $Ca_v1.3$ dans les CCI

Le rôle primordial des canaux calciques  $Ca_v1.3$  dans les synapses des CCI a été mis en évidence dans l'étude de Platzer et al., (2000) *via* la délétion de la sous-unité  $\alpha 1$  des  $Ca_v1.3$ , responsable de la dégénérescence des cellules ciliées et d'une surdité profonde chez la souris. Dans les CCI de ces souris mutées, il reste environ 10% du courant calcique initial, suggérant l'implication mineure d'autres familles de canaux calciques non caractérisées (Brandt et al., 2003).

Les canaux  $Ca_v1.3$  sont concentrés au niveau des ZA, à proximité des rubans, formant des microdomaines puis des nanodomaines calciques suite à un switch développemental après l'âge de 9 jours chez la souris (Wong et al., 2014). Cette organisation en nanodomaines permet aux synapses à rubans des CCI à la fois de contrôler l'exocytose synaptique des neurotransmetteurs avec une haute précision temporelle et d'encoder des faibles intensités sonores, proches du seuil auditif (Brandt et al., 2005). Ces nanodomaines entre les canaux  $Ca_v1.3$  et les vésicules synaptiques confèrent aux synapses des CCI, une insensibilité aux chélateurs de  $Ca^{2+}$  intracellulaires "lents" tels que l'EGTA (Neher et al., 1998; Vincent et al., 2014).

Comme vu précédemment, les canaux  $Ca_v1.3$  sont des canaux de type L, caractérisés par leur sensibilité aux dihydropyridines. Les différentes isoformes  $Ca_v1.3_L$  et  $Ca_v1.3_S$ , ont permis de démontrer l'importance de la partie C-terminale régulatrice dans la modulation de la sensibilité du canal aux dihydropyridines, telles que la nifédipine (Huang et al., 2013). Ainsi, les canaux  $Ca_v1.3_S$  sont faiblement sensibles à la nifédipine, contrairement aux longs isoformes  $Ca_v1.3_L$ . En présence de nifédipine extracellulaire, lors d'enregistrements électrophysiologiques, l'étude de Vincent et al. (2017) démontre que le courant calcique résiduel résistant et s'inactivant rapidement, conduit par les canaux  $Ca_v1.3_S$ , est suffisant pour déclencher la fusion normale des vésicules du RRP. Ces résultats suggèrent de façon pharmacologique l'implication des canaux  $Ca_v1.3_S$  dans la fusion rapide des vésicules.

Remarquablement, l'absence d'otoferline dans les CCI (chez les souris *Otof<sup>-/-</sup>*) est associée à la perte de cette composante d'inactivation rapide du courant calcique et à une diminution de l'expression des canaux  $Ca_v1.3_S$  (Vincent et al., 2017). Ces résultats suggèrent une possible interaction fonctionnelle entre l'otoferline et les canaux  $Ca_v1.3_S$  dans les CCI. De plus, des interactions directes entre la boucle cytoplasmique II-III du canal calcique  $Ca_v1.3$  et les domaines C2-D ou C2-ABDF de l'otoferline ont été suggérées *in vitro* (Ramakrishnan et al., 2009; Hams et al., 2017).

➤ Questions abordée durant la thèse :

➤ Quel sont les rôles spécifiques des isoformes  $Ca_v1.3_L$  et  $Ca_v1.3_S$  dans la transmission synaptique des CCI ?

➤ L'otoferline interagit-elle avec les canaux calciques  $Ca_v1.3_S$  ? Quels seraient les domaines C2 impliqués dans cette interaction ?

## Chapitre 6 : Objectifs de la Thèse

### A) Préciser le rôle de l'otoferline dans le cycle vésiculaire synaptique des CCI

L'encodage du signal acoustique en impulsions nerveuses se réalise au niveau des synapses à ruban des cellules ciliées internes (CCI). Cette transmission synaptique entre CCI et fibres afférentes du nerf auditif implique la fusion de vésicules synaptiques glutamatergiques aux zones actives (ZA), libérant le glutamate dans la fente synaptique et activant les récepteurs AMPA post-synaptiques. Cette transmission synaptique requière l'otoferline, une protéine apparentée à la famille des ferlines se composant d'un domaine transmembranaire (TM) et de domaines C2 pouvant lier le  $Ca^{2+}$  et les phospholipides (Roux et al., 2006). L'otoferline a été proposée comme jouant le rôle de senseur calcique dans l'exocytose des vésicules synaptiques, notamment comme un élément essentiel à leur recrutement aux rubans synaptiques (Pangrsic et al., 2010; 2012). Cependant, le rôle de l'otoferline en tant que senseur calcique des CCI ainsi que son implication dans les différentes étapes du cycle vésiculaire restent encore à démontrer.

Afin de démontrer le rôle de l'otoferline comme senseur calcique de l'exocytose des vésicules synaptiques, nous avons modifié génétiquement chez la souris les propriétés de liaison du  $Ca^{2+}$  sur son domaine C2-C, affectant son affinité calcique. Ce modèle permet de préciser le rôle de l'otoferline dans les étapes de fusion vésiculaire et de recrutement des vésicules à la membrane plasmique (voir Article 1 : *Otoferlin acts as a  $Ca^{2+}$  sensor for vesicle fusion and vesicle pool replenishment at auditory hair cell ribbon synapses*. eLife 2017).

### B) Caractériser le rôle des différents domaines C2 de l'otoferline dans l'exocytose synaptique des CCI

Les synapses à rubans des CCI assurent une libération rapide, précise et durable des vésicules synaptiques. L'otoferline, le senseur calcique de ces synapses infatigables, possède un domaine TM en C-terminal et six domaines C2 (A-F) (Roux et al., 2006; Michalski et al., 2017). Il est à noter que les senseurs calciques des synapses centrales, les synaptotagmines, possèdent uniquement deux domaines C2 (A-B) et un domaine TM situé en N-terminal (*Fig.13*). Des dizaines de mutations ont été répertoriées sur le gène OTOF, codant pour l'otoferline, entraînant une surdité profonde (DFNB9) (Yasunaga et al., 1999; Yasunaga et al., 2000). C'est en développant un modèle murin de cette surdité DFNB9, déficient pour l'otoferline (*Otof<sup>-/-</sup>*) et présentant une surdité profonde, que l'équipe de Roux et al., (2006) a caractérisé l'origine présynaptique de cette synaptopathie, les CCI présentant une exocytose vésiculaire fortement altérée.

L'objectif de cette étude a été de restaurer l'exocytose vésiculaire synaptique des CCI chez la souris *Otof*<sup>-/-</sup> à partir de l'expression virale de formes raccourcies de l'otoferline, appelées mini-Otof. Ainsi, nous avons caractérisé la fonction potentielle de différentes mini-otoferlines :

- Une mini-Otof ayant une structure analogue à celle des synaptotagmines, soit étant composée uniquement du domaine transmembranaire (TM) et des deux domaines C2 en C-terminal qui lui sont adjacents (C2-EF) (Fig.13). Ce module comprenant les domaines C2-EF de l'otoferline pourrait également être le résultat du clivage de l'otoferline entière native par la calpaïne, comme cela a été démontré pour la dysferline dans les cellules musculaires (Redpath et al., 2014).

- Une mini-Otof constituée du domaine TM et des trois domaines C2 en C-terminal qui lui sont adjacents (C2-DEF) (Fig.11). En effet, cette forme courte de l'otoferline est exprimée chez l'Homme suite à un épissage alternatif sans que son rôle soit encore connu (Yasunaga et al., 2000).

- Deux mini-Otof contenant les domaines C2-ACEF ou C2-ACDF (en plus du domaine TM toujours conservé) (Fig.13). La synthèse de ces deux formes raccourcies de l'otoferline, comprenant uniquement quatre domaines C2 sur les six de la forme native, a été réalisée par modélisation 3D *in silico*. Cette méthode de modélisation a récemment été appliquée à la dysferline, générant une mini-dysferline composée de quatre domaines C2 sur les sept de la forme complète, capable de restaurer le phénotype musculaire chez un modèle murin déficient pour la dysferline (Llanga et al., 2014).

L'expression spécifique de ces mini-Otof dans les CCI de souris *Otof*<sup>-/-</sup> a été effectuée en leurs injectant, *via* la fenêtre ronde de la cochlée, des vecteurs viraux AAV2/8 (Adeno-associated-virus, de sérotype 2/8), contenant nos mini-Otof et pouvant infecter préférentiellement les CCI (voir Chapitre 7). L'effet de l'expression de chaque mini-Otof a alors été testé sur la fonction auditive de la souris *Otof*<sup>-/-</sup> par la mesure des potentiels auditifs évoqués ("Auditory Brainstem Responses" et produits de distorsions). Le recouvrement éventuel de la transmission synaptique des CCI pour chaque mini-Otof a été étudié par des enregistrements électrophysiologiques en patch-clamp sur explants d'organe de Corti (voir Article 2 sous presse : "*Viral transfer of mini-otoferlins partially restores the fast component of exocytosis and uncovers ultrafast endocytosis in auditory hair cells of otoferlin knock-out mice*" Journal of Neuroscience).

### **C) Mettre en évidence l'existence d'une endocytose ultra-rapide dans les CCI**

L'exocytose des vésicules synaptiques des CCI peut atteindre des vitesses remarquablement élevées, dépassant plusieurs milliers de vésicules par seconde. Ces vitesses d'exocytose peuvent être



soutenues de façon infatigable et varier avec une précision temporelle inférieure à la milliseconde en fonction de l'intensité du stimulus.

Une des questions fondamentales restant actuellement sans réponse concerne la façon dont les CCI compensent cet apport massif de vésicules à la membrane plasmique. Des mécanismes d'endocytoses compensatoires tout aussi rapides afin de recycler le pool vésiculaire et d'empêcher une expansion de la membrane plasmique présynaptique restent à identifier. La présence de plusieurs acteurs de l'endocytose a été démontré dans les CCI, comme la protéine adaptatrice AP-2 et la clathrine, toutes deux impliquées dans la forme d'endocytose clathrine-dépendante dont la constante de temps serait de l'ordre de plusieurs secondes (Siegel and Brownell, 1986; Neef et al., 2014; Jung et al., 2015). Une voie d'endocytose plus rapide (~300 ms) et clathrine-indépendante a également été mise en évidence. Ces modes d'endocytose semblent cependant insuffisants pour recycler efficacement les vésicules synaptiques des CCI.

Récemment, dans les synapses de l'hippocampe, a été décrite une endocytose qualifiée d'ultra-rapide avec une constante de temps d'environ 50 ms (Watanabe et al., 2013b; Watanabe 2014). Cette endocytose ultra-rapide est clathrine-indépendante et implique l'action de la dynamine. Nous avons donc cherché à déterminer si les CCI présentent une forme d'endocytose ultra-rapide semblable à celle trouvée dans les synapses hippocampiques.

Pour cela nous avons étudié l'endocytose en mesurant la variation de capacité membranaire ( $\Delta C_m$ ) :

- des CCI en présence d'un inhibiteur spécifique de la dynamine
- des CCI *Otof*<sup>-/-</sup> exprimant les différentes mini-otoferlines

(voir Article 2 sous presse : "*Viral transfer of mini-otoferlins partially restores the fast component of exocytosis and uncovers ultrafast endocytosis in auditory hair cells of otoferlin knock-out mice*" Journal of Neuroscience).

#### **D) Caractériser le rôle des isoformes des canaux calciques Cav1.3 dans l'exocytose synaptique des CCI**

L'otoferline est un senseur calcique déclenchant la fusion des vésicules synaptiques lors de l'activation voltage-dépendante des canaux calciques de type Ca<sub>v</sub>1.3, situés au pôle basal des CCI (Kollmar et al. 1997; Platzer et al., 2000; Brandt et al., 2003). De l'épissage alternatif de l'exon 43 du gène CACNA1D résulte deux isoformes du canal Ca<sub>v</sub>1.3 dans sa partie C-terminale régulatrice : l'isoforme longue (Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub>) et l'isoforme courte (Ca<sub>v</sub>1.3<sub>S</sub>) (Scharinger et al., 2015). Les isoformes

Ca<sub>v</sub>1.3<sub>S</sub> possèdent une partie C-terminale régulatrice tronquée, où sont présents des domaines IQ et pré-IQ sur lesquels se fixe la calmoduline (CaM), inactivant rapidement le canal calcique. Les isoformes Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub>, possédant la partie C-terminale régulatrice dans son intégralité, présentent quant à eux, deux domaines de régulation, un proximal et un distal (PCRD et DCRD) (Fig.14). La structure tridimensionnelle de ces domaines PCRD et DCRD rentrerait en compétition avec le site de fixation de la CaM, diminuant donc la composante rapide de l'inactivation du canal. Basée sur la propriété différentielle de sensibilité aux dihydropyridines (Huang et al., 2013), l'étude de Vincent et al., (2017) propose que les isoformes courtes Ca<sub>v</sub>1.3<sub>S</sub> sont suffisantes pour assurer l'exocytose des vésicules du RRP mais ne permettent pas le ravitaillement vésiculaire des zones actives.

Dans le but de démontrer les rôles spécifiques de ces isoformes des canaux calciques, nous avons utilisé la technique CRISPR-Cas9 permettant de supprimer spécifiquement la partie C-terminale régulatrice PCRD-DCRD des Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub>. Pour ce faire, nous avons utilisé des souris exprimant spécifiquement l'enzyme Cas9 dans les CCI (voir Chapitre 8). Afin de guider la Cas9 jusqu'à sa séquence cible, l'exon 43, un guide ARN (ou "gRNA") contenu dans un vecteur AAV était alors injecté *via* la fenêtre ronde de la cochlée des souris.

Les conséquences de cette troncation de la partie C-terminale régulatrice des isoformes Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub>, engendrée par la Cas9 dans les CCI, ont été étudiées sur le phénotype auditif des souris (ABR et produits de distorsion). De plus, les effets éventuels au niveau cellulaire sur les propriétés des courants calciques et sur l'exocytose des CCI a été étudié par des enregistrements électrophysiologiques en patch-clamp sur explants d'organe de Corti (voir Article 3 en préparation "*The use of CRISPR-Cas9 genome editing technology in vivo to probe the role of Ca<sub>v</sub>1.3 Ca<sup>2+</sup> channel isoforms insynaptic transmission of mouse auditory hair cells*").

## Chapitre 7 : Expression de mini-otoferlines dans les CCI de souris *Otof*<sup>-/-</sup> par injection intra-cochléaire de vecteur AAV

Afin d'explorer le rôle des différents domaines C2 de l'otoferline et de restaurer potentiellement l'audition et la transmission synaptique des CCI chez la souris *Otof*<sup>-/-</sup>, nous avons utilisé des vecteurs AAV contenant des formes raccourcies de l'otoferline que nous avons injectées dans la cochlée des souris (Géléc and Holt, 2014; Mittal et al., 2017; Emptoz et al., 2017).

### A) Choix entre vecteurs viraux et non-viraux

	Vecteurs	Avantages	Inconvénients
Vecteurs viraux	Adénovirus	- Infection des cellules en division ou quiescentes - Expression à long terme du transgène - Grande capacité d'insertion (8kb) - Facilité d'obtention	- Forte réponse immune de l'hôte - Expression transitoire du virus
	AAV (virus adéno-associés)	- Infection des cellules en division ou quiescentes - Expression à long terme du transgène - Faible réponse immune - Non intégratif - Non pathogène	- La capacité d'insertion est limitée (4.7kb)
	Rétrovirus	- Faible réponse immune	- Incapacité à infecter les cellules quiescentes - Risque de mutagenèse insertionnelle
	Herpes simplex virus	- Très grande capacité d'insertion (31kb) - Pas d'intégration dans le génome	- Faible efficacité de transduction - Possibilité de recombinaison
	Lentivirus	- Infection des cellules en division ou quiescentes - Bonne efficacité de transduction - Faible réponse immune - Grande capacité d'insertion (8kb)	- Intégration aléatoire dans le génome - Peu/ pas d'infection des cellules ciliées
Vecteurs non-viraux	Liposomes cationiques	- Non infectieux - Facilité d'obtention - Pas de limite de taille d'insert	- Faible spécificité - Peut provoquer une réponse immune sévère
	Polymères	- Non immunogène - Facilité d'obtention	- Faible efficacité - Peut provoquer une réponse immune sévère - Toxique pour les cellules
	Electroporation	- Non immunogène - Haute efficacité de transfection	- Dommages tissulaires - Transfert du gène limité à la zone ciblée - nécessité d'une chirurgie pour des organes internes

**Tableau 2 : Avantages/inconvénients des vecteurs viraux et non viraux.**

Il y a actuellement deux façons de transférer des gènes d'intérêt : *via* des vecteurs viraux ou des non-viraux. Le principal avantage des vecteurs viraux est leur grande efficacité d'infection avec des tropismes tissulaires ou cellulaires distincts. Ils présentent cependant une toxicité immunologique et génétique potentielle, pouvant alors provoquer des réactions inflammatoires ou des mutations insertionnelles (Sacheli et al., 2013) (*Tableau 2*).

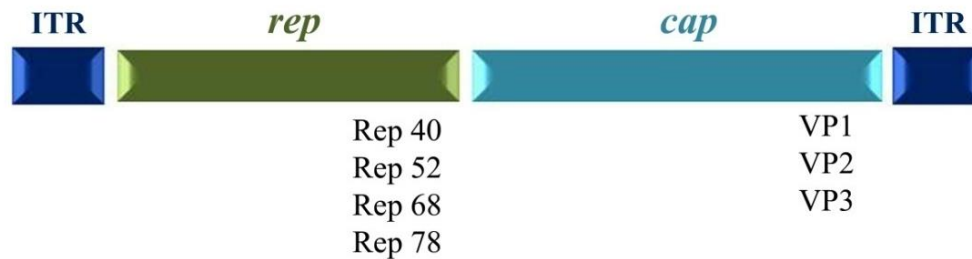
Les vecteurs non-viraux ont été élaborés pour contrer la possible immunogénéicité, la taille de l'insert limitée et les difficultés de production des vecteurs viraux. Cependant, malgré la faible toxicité, la non-intégration au génome et l'absence de limite dans la taille de l'insert, les vecteurs non viraux ont une utilisation limitée de par leur faible efficacité de transduction, leur manque de spécificité et un faible taux d'expression du transgène (Sacheli et al., 2013; Meyer et al., 2013) (*Tableau 2*).

Les AAV, malgré leur taille d'insertion limitée, sont non-pathogènes et capables d'infecter les CCI avec une expression à long terme (Emptoz et al., 2017). Nous les avons donc choisi pour transférer nos gènes d'intérêts, les différentes constructions de mini-otoferlines, dans les souris déficientes pour ce senseur calcique (*Otof*<sup>-/-</sup>).

## **B) Les AAV**

Les AAV, découverts en 1965, font partie de la famille des parvovirus (Atchison et al., 1965). L'AAV est un petit virus (20-25 nm) non-enveloppé qui n'est pas actuellement connu comme étant responsable de pathologies. En effet, il a été montré que ~80% des adultes sont séropositifs à l'AAV mais l'infection n'est associée à aucun symptôme (Calcedo et al., 2009), ce qui lui confère un avantage non négligeable en thérapie génique.

Ils sont composés d'ADN linéaire simple brin de 4.7 kb (Atchison et al., 1965; Siegl et al., 1985; Büning et al., 2008) qui contient deux gènes appelés *rep* (Réplication) et *cap* (Capside) encadrés par deux séquences nucléotidiques symétriques, les ITR (pour "inverted terminal repeats"; *Fig.15*) (Srivasata et al., 1983). Les ITR forment une structure secondaire en forme de T et sont nécessaires à la réplication des gènes situés entre ces deux séquences. La partie Rep code pour des protéines de régulation (Rep 40, 52, 68 et 78) impliquées dans la réplication du génome tandis que la partie Cap produit des protéines d'encapsidation (VP1, 2 et 3) formant une capsidie sphérique (*Fig.15*).



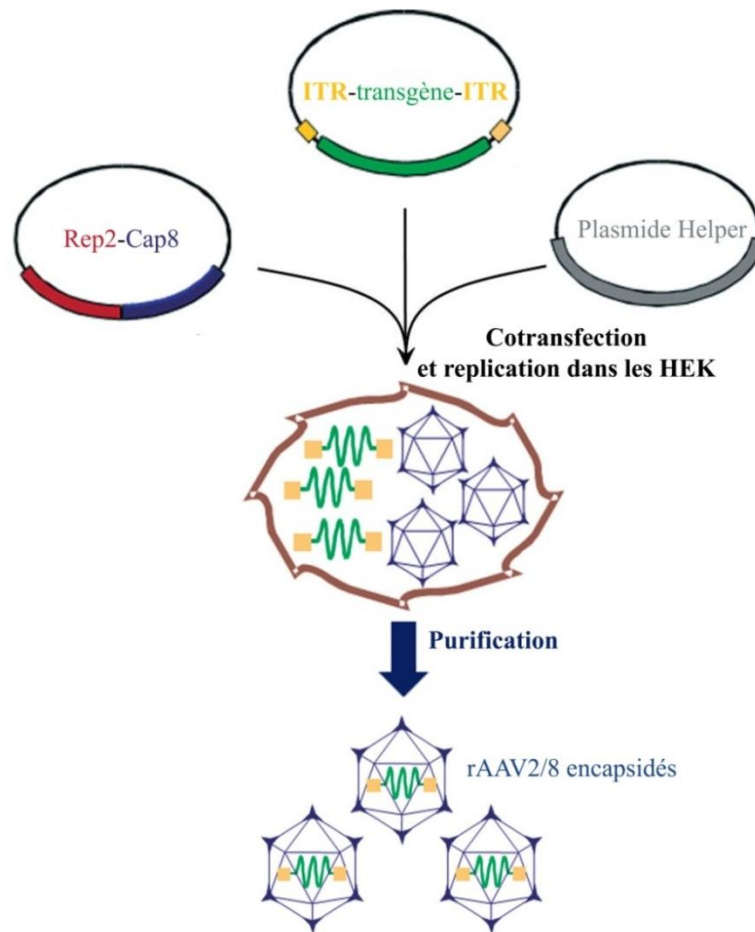
**Figure 15 : Composition d'un AAV sauvage.** Le génome de l'AAV se compose de deux séquences ITR situées en 5' et 3', encadrant une séquence Rep codant pour quatre protéines de réplication et une séquence Cap codant pour trois protéines d'encapsidation. (Image adaptée de Büning et al., 2008)

L'AAV ne peut se répliquer dans la cellule hôte sans une co-infection par un virus auxiliaire (un virus "helper") tel que l'adénovirus. Une fois l'endocytose effectuée, l'AAV est conduit *via* le trafic endosomal au noyau de cellule où il va être transformé en épisode circulaire double-brin et ainsi être maintenu de façon extra-chromosomique. La décapsidation et l'entrée de l'AAV dans le noyau sont des mécanismes encore inconnus.

Les AAV utilisés en thérapie génique, les rAAV (pour "recombinant AAV") sont déficients pour la réplication et pour l'intégration dans le génome. En effet les séquences entourées par les ITR, les séquences Rep et Cap (soit 96% du génome viral; Carter and Samulski, 2000), sont remplacées par les séquences du gène d'intérêt, dans le cas de notre étude par les séquences des différentes mini-otoferlines. Ainsi les AAV sont produits avec une triple transfection de cellules HEK293 (pour "human embryonic kidney") (Grieger et al., 2006) par (*Fig.16*):

- un plasmide contenant le gène d'intérêt (mini-otoferline) encadré par les ITR
- un plasmide contenant les gènes *rep* et *cap* (sans ITR)
- un plasmide contenant un virus "helper"

Vient ensuite l'étape de purification des vecteurs qui peut s'effectuer par différentes méthodes (ultracentrifugation, chromatographie, gradient de chlorure...) afin de donner des rAAV encapsidés et stockés dans une solution PBS, à une concentration optimale  $>10^{12}$  GC/ml (pour "Genome Copies") et conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Figure 16 : Représentation schématique de la production d'AAV.** Les plasmides contenant le gène d'intérêt (transgène), les gènes *rep* et *cap* et un virus "helper" sont co-transfectés dans des cellules HEK. Les particules virales rAAV encapsidées sont ensuite obtenues par purification. Image adaptée de Büning et al., 2008.

Il existe 11 sérotypes d'AAV et chacun possède un tropisme tissulaire/cellulaire distinct suivant la composition en aa de sa capside et du type de récepteurs utilisé pour son internalisation dans la cellule cible (Büning et al., 2008). L'AAV de sérotype 2 (AAV2) est le plus utilisé car mieux caractérisé au niveau de sa structure et de sa production (voir revue : Gonçalves, 2005). La capside de l'AAV2 entre en interaction avec ses récepteurs primaires exprimés sur la membrane de la cellule hôte : les récepteurs des protéoglycanes à chaînes héparane sulfate (HSPG) (Summerford and Samulski, 1998). Ces derniers sont ubiquitaires ce qui se traduit par un large tropisme tissulaire concernant les AAV2. La capside joue donc un rôle important puisqu'elle influence la spécificité, l'efficacité de transduction et la bio-distribution de l'AAV dans le tissu (van Vliet et al., 2008). L'approche commune dans le design d'AAV est alors d'utiliser les ITR et la séquence Rep sauvage de l'AAV2 (Rep2) mais la séquence Cap d'un autre sérotype affichant le tropisme cellulaire plus ciblé (*Fig.16*: pour notre étude Cap8), le rAAV sera alors noté AAV2/8 ou AAV8.

### C) Thérapie génique par expression d'AAV dans la cochlée

Très récemment, plusieurs études ont montré des avancées prometteuses dans l'utilisation de la thérapie génique dans la cochlée, en utilisant des modèles murins de surdités humaines. Cependant, d'une étude à l'autre, les résultats de tropisme cellulaire peuvent être variables (voir revue : Sacheli et al., 2013: Tableau 3).

Le premier succès significatif de thérapie génique sur le système auditif a été réalisé sur un modèle de souris sourdes, déficientes pour le transporteur vésiculaire du glutamate (VGLUT-3; Akil et al. 2012), modèles de la surdité congénitale autosomique dominante DFA25 chez l'humain. L'injection intra-cochléaire d'un AAV2/1-VGLUT3 a restauré l'expression du transporteur du glutamate dans les vésicules synaptiques des CCI. Ce traitement par AAV a permis le rétablissement de la neurotransmission synaptique entre les CCI et les fibres afférentes et ainsi de restaurer la fonction auditive de ces souris. L'étude de Askew et al., (2015) a également identifié l'AAV2/1 comme étant efficace dans la transduction des CCI (visualisation par le reporteur fluorescent eGFP), en comparaison aux sérotypes capsidiques 2, 6, 8 et 9. Les auteurs mettent en évidence une restauration de la fonction auditive chez le modèle de souris *Beethoven* déficient pour les protéines TMC, (modèle des surdités humaines DFB7/11 et DFBA36) en injectant un AAV2/1-TMC1 ou TMC2 (Askew et al., 2015). Cependant, c'est l'AAV2/8 qui est transduit de façon la plus efficace dans les CCI dans l'étude de Chien et al., (2015), permettant de restaurer la fonction auditive chez les souris modèles du syndrome de Usher de type 2, touchant la protéine d'échafaudage whirline.

En plus de tester plusieurs sérotypes capsidiques, certaines études se sont intéressées à différents facteurs et montrent que l'infection des cellules cibles dépend de nombreux facteurs comme du lieu de production de l'AAV (selon les sociétés), de son titre, de son promoteur, des doses administrées, du gène d'intérêt inséré ou encore de la cinétique d'expression de ce dernier (Wu et al., 2006; Askew et al., 2015; Emptoz et al., 2017).

Des études récentes ont souligné la difficulté des AAV, tous sérotypes confondus, à infecter à la fois les CCI mais également les CCE (Landegger et al., 2017; Suzuki et al., 2017). Les auteurs ont alors testé un AAV ayant été reconstruit *in silico* qui se rapproche de l'état ancestral de la capside virale des AAV de sérotypes 1-3 et 7-9 (Zinn et al., 2015). Cet AAV synthétique, appelé Anc80L65 (ou Anc80), est capable de transduire efficacement les CCI et CCE mais également les cellules du vestibule. L'Anc80 a alors été utilisé dans la restauration de l'audition chez un modèle murin de la surdité USH1C (Pan et al., 2017).

Dans le cadre de notre étude impliquant les différentes mini-Otof (voir Article 2), nous avons choisi d'utiliser les AAV2/8 produits par la société Penn Vector Core (USA) car cet AAV a été montré comme étant spécifique des CCI suite à une injection intra-cochléaire *via* la fenêtre ronde (Emptoz et al., 2017; Dulon et al., 2018).

### **D) Injection intra-cochléaire d'AAV *via* la fenêtre ronde**

L'anatomie et la physiologie de l'oreille interne sont des avantages pour la thérapie génique de par son isolement au reste de l'organisme et sa protection à la barrière hématologique qui limite la diffusion systémique et une réponse immunogène (Meyer et al., 2013; voir revue : Géléoc and Holt, 2014). La dissémination du vecteur thérapeutique aux cellules ciliées est favorisée par la périlymphe, où baignent ses dernières (Chien et al., 2015).

Deux techniques principales d'injections trans-tympanique ont été décrites dans la littérature : la cochléostomie ou *via* la fenêtre ronde. Nous avons choisi pour notre étude d'utiliser la technique d'injection *via* la fenêtre ronde pour son absence d'inflammation des tissus, d'atrophie de la strie vasculaire ou de dégénérescence des cellules rapportées lors de la technique de cochléostomie (Lalwani et al., 1997; Kawamoto et al., 2001; Jero et al., 2001; Akil et al., 2012; Chien et al., 2015). L'approche directe à travers la membrane de la fenêtre ronde permet de mieux contrôler le site d'injection et le volume inoculé. Différentes études ont montré que cette injection permet une bonne distribution à travers la périlymphe et donc une transduction efficace des cellules ciliées sans endommager l'architecture de la cochlée et préserver ainsi durablement la fonction auditive (Stover et al., 1999; Akil et al., 2012; Xia et al., 2012; Askew et al., 2015). Il a été observé qu'un mois après injection, les seuils auditifs des animaux traités par cochléostomie peuvent se dégrader de 50 à 60 dB alors que *via* la fenêtre ronde, les seuils restent stables vers 30 dB (Chien et al., 2015; Emptoz et al., 2017). Cette technique d'injection est effectuée comme décrite par Akil et al., (2012, 2015) à l'âge de trois jours post-natal chez la souris anesthésiée par hypothermie.



## Chapitre 8 : Exploration du rôle spécifique d'isoformes des canaux calciques $Ca_v1.3$ des CCI : approche *in vivo* chez la souris par édition génique CRISPR-Cas9

Le système CRISPR (pour "clustered regularly interspaced short palindromic repeats") a été découvert en 2000 par Francisco Mojica, comme mécanisme immunitaire utilisé par les bactéries pour se protéger des infections virales. Lorsque les bactéries sont infectées une première fois, elles mémorisent un élément génétique de leur infection, en intégrant un court fragment à leur génome. Lorsqu'elles sont de nouveau en contact avec le virus, elles sont alors capables de transcrire la séquence mémorisée qui guide alors une endonucléase, appelée Cas9, à la destruction de l'ADN viral. Ce système CRISPR-Cas9 désigne donc en microbiologie, la structure du génome qui supporte l'immunité adaptative de la bactérie. En biotechnologie, c'est le même mot qui est utilisé pour décrire la technique d'édition génique par le duo composé d'une enzyme Cas9 (extraite généralement de *Streptococcus pyogenes*, SpCas9) et de son guide ARN artificiel (gRNA), technique révélée en 2012 par Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier (Jinek et al., 2012).

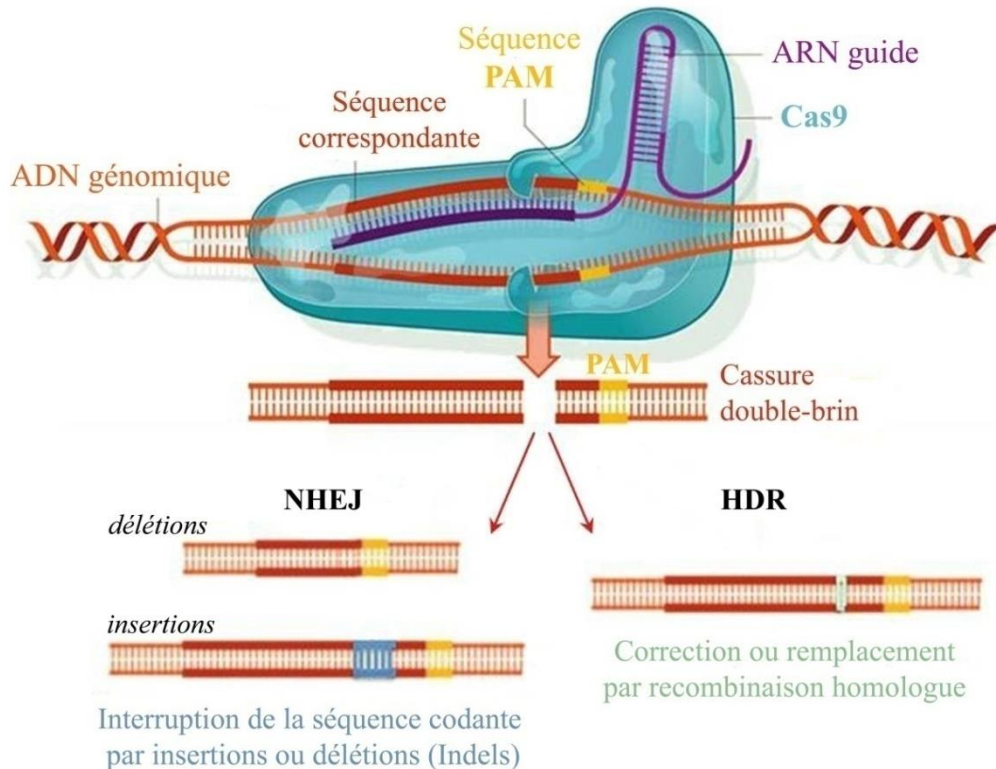
Au contact de l'ADN double brin qu'elle va ensuite découper, la Cas9 reconnaît tout d'abord une séquence conservée de 2 à 4 paire de bases, la séquence PAM (pour "Protospacer Adjacent Motif") (Mojica et al., 2005; Anders et al., 2014; Horvath et al., 2008). Cette séquence PAM est absolument nécessaire à la liaison spécifique de la séquence cible et dépend de l'espèce de la Cas9 (ex : 5' NGG 3' pour la SpCas9, utilisée dans notre étude). Après fixation à la PAM, la Cas9 vérifie la présence d'une complémentarité entre le gRNA et la séquence ADN (*Fig.17*) (Sternberg et al., 2014). S'il y a complémentarité, un clivage double brin à bouts francs est effectué par la Cas9, trois nucléotides en amont de l'extrémité 3' de la PAM.

La cellule hôte dispose alors de deux mécanismes majeurs pour réparer le génome au niveau du site de coupure double brins (*Fig.17*) :

- le NHEJ (pour "non homologous end joining") est une réparation par une voie qui commet fréquemment des erreurs comme des insertions ou délétions (indels) susceptibles de décaler le cadre de lecture
- le HDR (pour "homology direct repair") est une voie qui répare la cassure ou utilise un brin donneur (ou modèle) afin de combler la coupure (voir revue : Sander and Joung 2014)

Il est cependant possible que le gRNA utilisé pour amener la Cas9 à sa séquence cible, ait des sites additionnels pour lesquels une complémentarité partielle existe. Ces sites sont appelés "off-targets" (hors cibles en français) et doivent donc être pris en compte lors de la construction des gRNA

expérimentaux. Plusieurs logiciels (dont <http://crispor.tefor.net> que nous avons utilisé) sont capables d'identifier par algorithmes, les gRNA qui ont des complémentarités off-targets.



**Figure 17 : Système du complexe CRISPR-Cas9.** L'enzyme Cas9 reconnaît la séquence PAM et vérifie la correspondance entre l'ARN guide et la séquence génomique. Lorsqu'il y a complémentarité, l'enzyme effectue une cassure double-brin. Des mécanismes de réparation au niveau du site de coupure sont alors effectués par la cellule. Les issues sont soit le NHEJ, commettant des indels, la séquence codante est alors raccourcie; soit le HDR qui peut être utilisé pour introduire des mutations ponctuelles spécifiques ou pour insérer des séquences souhaitées par des matrices donneur d'ADN fournies de façon exogène (Image adaptée de Tu et al., 2015).

La technique du CRISPR-Cas9 ouvre la voie à de nouvelles solutions de thérapies géniques où des études ont montré son efficacité *in vivo* comme par exemple sur un modèle murin de la dystrophie musculaire de Duchenne (Tabebordbar et al., 2016; Nelson et al., 2016). Dans ce cas, la protéine dystrophine devient tronquée mais fonctionnelle et est maintenue au moins six mois après l'action du CRISPR-Cas9.

Au niveau de l'oreille interne, comme les cellules ciliées sont quiescentes l'unique voie de réparation du génome après action de la Cas9 est la voie NHEJ. La première étude utilisant la technologie CRISPR-Cas9 dans la cochlée est l'étude de Gao et al., (2018) qui démontre la possibilité *in vivo* de parvenir à l'extinction spécifique de l'allèle dominant muté chez un modèle murin (*Beethoven*) de surdité génétique humaine, conduisant à une amélioration du phénotype auditif.

C'est en 2016 que le premier essai clinique chez l'Homme utilisant la technique CRISPR-Cas9 a commencé, sur l'immunothérapie anticancéreuse du mélanome métastatique et du cancer du poumon (Cyranski et al., 2016, voir revue : Jordan, 2016). Depuis une dizaine d'autres études sont en cours, en Chine et aux Etats-Unis (source: *ClinicalTrials.gov*).

Afin de comprendre le rôle des deux différentes isoformes des canaux calciques  $Ca_v1.3_S$  et  $Ca_v1.3_L$  dans la transmission synaptique des CCI, nous avons choisi d'utiliser la technique CRISPR-Cas9. En effet, cette technologie nous a permis d'éditer de façon spécifique l'exon 43 du gène CACNA1D du canal  $Ca_v1.3$  et ainsi de générer uniquement des isoformes sans partie C-terminale régulatrice. Cependant, les canaux  $Ca_v1.3$  n'étant pas exprimés exclusivement dans les cellules ciliées (Platzer et al., 2000), nous avons voulu permettre l'expression de la Cas9 uniquement dans ces dernières afin d'éviter tout effet indésirable. Pour cela, nous avons croisé deux lignées de souris. La première (knock-in  $H11^{LSL-Cas9}$ , Jackson Lab) possède un codon STOP encadré par deux sites loxP (cassette LSL) empêchant l'expression constitutive de la séquence enzymatique de la Cas9 qui lui succède. La seconde lignée de souris utilisée ( $Myo15^{tm1.1(cre)Ugds}$ ), exprime l'enzyme Cre-recombinase sous l'action d'un promoteur spécifique des cellules ciliées, celui du gène de la myosine 15 (Caberlotto et al., 2011). Le croisement de ces lignées nous a permis d'obtenir une lignée de souris dont la Cre-recombinase enlève la cassette LSL (Platt et al., 2014) permettant alors une expression et une activation spécifique de la Cas9 dans les cellules ciliées. Afin de guider la Cas9 jusqu'à sa séquence cible, dans l'exon 43 du gène CACNA1D, le gRNA correspondant a été inséré dans un vecteur AAV2/8. L'injection intra-cochléaire de cet AAV à l'âge de P3, permet au gRNA d'être exprimé dans les CCI et alors de guider la Cas9 jusqu'à l'exon 43 où elle induira une cassure double-brin, générant alors uniquement des formes courtes, équivalentes aux  $Ca_v1.3_S$ . Les conséquences de l'absence de la partie C-terminale régulatrice ont ensuite été étudiées au niveau du phénotype auditif et de la transmission synaptique des CCI (voir Article 3).

# Résultats

# Article 1

## **Otoferlin acts as a Ca<sup>2+</sup> sensor for vesicle fusion and vesicle pool replenishment at auditory hair cell ribbon synapses**

Michalski N, Goutman JD, Auclair SM, Boutet de Monvel J, **Tertrais M**, Emptoz A, Parrin A, Nouaille S, Guillon M, Sachse M, Ciric D, Bahloul A, Hardelin JP, Sutton RB, Avan P, Krishnakumar SS, Rothman JE, Dulon D, Safieddine S and Petit C (eLife, 2017)  
(<https://elifesciences.org/articles/31013>)

**Introduction :**

Les synapses à rubans des cellules ciliées internes assurent une libération rapide, précise et durable des vésicules synaptiques. Ce processus d'exocytose requiert un senseur calcique particulier, l'otoférine. L'otoférine est une grande protéine associée aux vésicules synaptiques et constituée de six domaines C2 (A-F) pouvant lier le  $\text{Ca}^{2+}$  et interagir avec les phospholipides membranaires. Le rôle précis de l'otoférine dans les différentes étapes du cycle des vésicules synaptiques des CCI reste encore mal connu. Ce senseur calcique a été proposé comme étant un élément essentiel au recrutement mais son possible rôle dans la fusion finale des vésicules reste encore controversé (Pangrsic et al., 2010; 2012). Afin de déterminer l'implication de l'otoférine comme senseur calcique dans l'exocytose des vésicules synaptiques, nous avons généré un modèle murin exprimant une otoferline dont deux acides aminés aspartates ont été substitués en deux alanines sur son domaine C2-C. Ces substitutions permettent de modifier l'affinité du senseur au  $\text{Ca}^{2+}$  et d'en mesurer l'impact sur l'audition et l'exocytose des vésicules synaptiques.

**Résultats :**

- Les seuils des réponses auditives (amplitude de la première onde; ABR) des souris *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> sont significativement augmentés comparés aux souris contrôles *Otof*<sup>+/+</sup> et *Otof*<sup>C2C/+</sup>. Les produits de distorsions acoustiques issus de l'activité amplificatrice des CCE restent normaux, indiquant l'apparition d'une synaptopathie auditive
- Au niveau des CCI *Otof*<sup>C2C/C2C</sup>, l'expression de l'otoférine, l'ultrastructure des rubans synaptiques et les courants calciques sont normaux.
- La sensibilité calcique de l'exocytose rapide des vésicules des CCI *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> est diminuée (facteur 5; passant d'un Kd de 2 à 10  $\mu\text{M}$  environ)
- L'exocytose au cours de stimulations répétées ou soutenues, un processus faisant intervenir le recrutement des vésicules synaptiques aux zones actives, est également altéré

**Conclusion :**

En modifiant uniquement les propriétés de liaison calcique du domaine C2-C de l'otoférine, nous avons pu établir le rôle de l'otoférine en tant que senseur calcique régulant plusieurs étapes du cycle des vésicules synaptiques des CCI. Nous montrons que l'otoférine intervient à la fois dans le recrutement des vésicules synaptiques mais aussi dans l'étape finale de fusion avec la membrane plasmique.

# Otoferlin acts as a $\text{Ca}^{2+}$ sensor for vesicle fusion and vesicle pool replenishment at auditory hair cell ribbon synapses

Nicolas Antoine Michalski<sup>1,2,3\*</sup>, Juan D Goutman<sup>4</sup>, Sarah Marie Auclair<sup>5</sup>, Jacques Boutet de Monvel<sup>1,2,3</sup>, Margot Tertrais<sup>2,6</sup>, Alice Emptoz<sup>1,2,3</sup>, Alexandre Parrin<sup>1,2,3</sup>, Sylvie Nouaille<sup>1,2,3</sup>, Marc Guillon<sup>7</sup>, Martin Sachse<sup>8</sup>, Danica Ciric<sup>1,2,3</sup>, Amel Bahloul<sup>1,2,3</sup>, Jean-Pierre Hardelin<sup>1,2,3</sup>, Roger Bryan Sutton<sup>9,10</sup>, Paul Avan<sup>11,12,13</sup>, Shyam S Krishnakumar<sup>5,14</sup>, James E Rothman<sup>5,14</sup>, Didier Dulon<sup>2,6†</sup>, Saaid Safieddine<sup>1,2,3†</sup>, Christine Petit<sup>1,2,3,15,16†\*</sup>

<sup>1</sup>Unité de Génétique et Physiologie de l'Audition, Institut Pasteur, Paris, France; <sup>2</sup>UMRS 1120, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, France; <sup>3</sup>Sorbonne Universités, UPMC Université Paris, Paris, France; <sup>4</sup>Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; <sup>5</sup>Department of Cell Biology, Yale University School of Medicine, New Haven, United States; <sup>6</sup>Laboratoire de Neurophysiologie de la Synapse Auditive, Bordeaux Neurocampus, Université de Bordeaux, Bordeaux, France; <sup>7</sup>Wave Front Engineering Microscopy Group, Neurophotonics Laboratory, Centre National de la Recherche Scientifique, University Paris Descartes, Paris, France; <sup>8</sup>Center for Innovation & Technological Research, Utrapole, Institut Pasteur, Paris, France; <sup>9</sup>Department of Cell Physiology and Molecular Biophysics, Texas Tech University Health Sciences Center, Lubbock, United States; <sup>10</sup>Center for Membrane Protein Research, Texas Tech University Health Sciences Center, Lubbock, United States; <sup>11</sup>Laboratoire de Biophysique Sensorielle, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France; <sup>12</sup>UMR 1107, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Clermont-Ferrand, France; <sup>13</sup>Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France; <sup>14</sup>Department of Clinical and Experimental Epilepsy, Institute of Neurology, University College London, London, United Kingdom; <sup>15</sup>Syndrome de Usher et Autres Atteintes Rétino-Cochléaires, Institut de la Vision, Paris, France; <sup>16</sup>Collège de France, Paris, France

\*For correspondence: nicolas.michalski@pasteur.fr (NAM); christine.petit@pasteur.fr (CP)

†These authors contributed equally to this work

Competing interest: See page 29

Funding: See page 29

Received: 11 August 2017

Accepted: 06 November 2017

Published: 07 November 2017

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

© Copyright Michalski 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.

**Abstract** Hearing relies on rapid, temporally precise, and sustained neurotransmitter release at the ribbon synapses of sensory cells, the inner hair cells (IHCs). This process requires otoferlin, a six  $\text{C}_2$ -domain,  $\text{Ca}^{2+}$ -binding transmembrane protein of synaptic vesicles. To decipher the role of otoferlin in the synaptic vesicle cycle, we produced knock-in mice (*Otof*<sup>Ala515,Ala517/Ala515,Ala517</sup>) with lower  $\text{Ca}^{2+}$ -binding affinity of the  $\text{C}_2\text{C}$  domain. The IHC ribbon synapse structure, synaptic  $\text{Ca}^{2+}$  currents, and otoferlin distribution were unaffected in these mutant mice, but auditory brainstem response wave-I amplitude was reduced. Lower  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity and delay of the fast and sustained components of synaptic exocytosis were revealed by membrane capacitance measurement upon modulations of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, by varying  $\text{Ca}^{2+}$  influx through voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$ -channels or  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging. Otoferlin thus functions as a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor, setting the rates of primed

vesicle fusion with the presynaptic plasma membrane and synaptic vesicle pool replenishment in the IHC active zone.

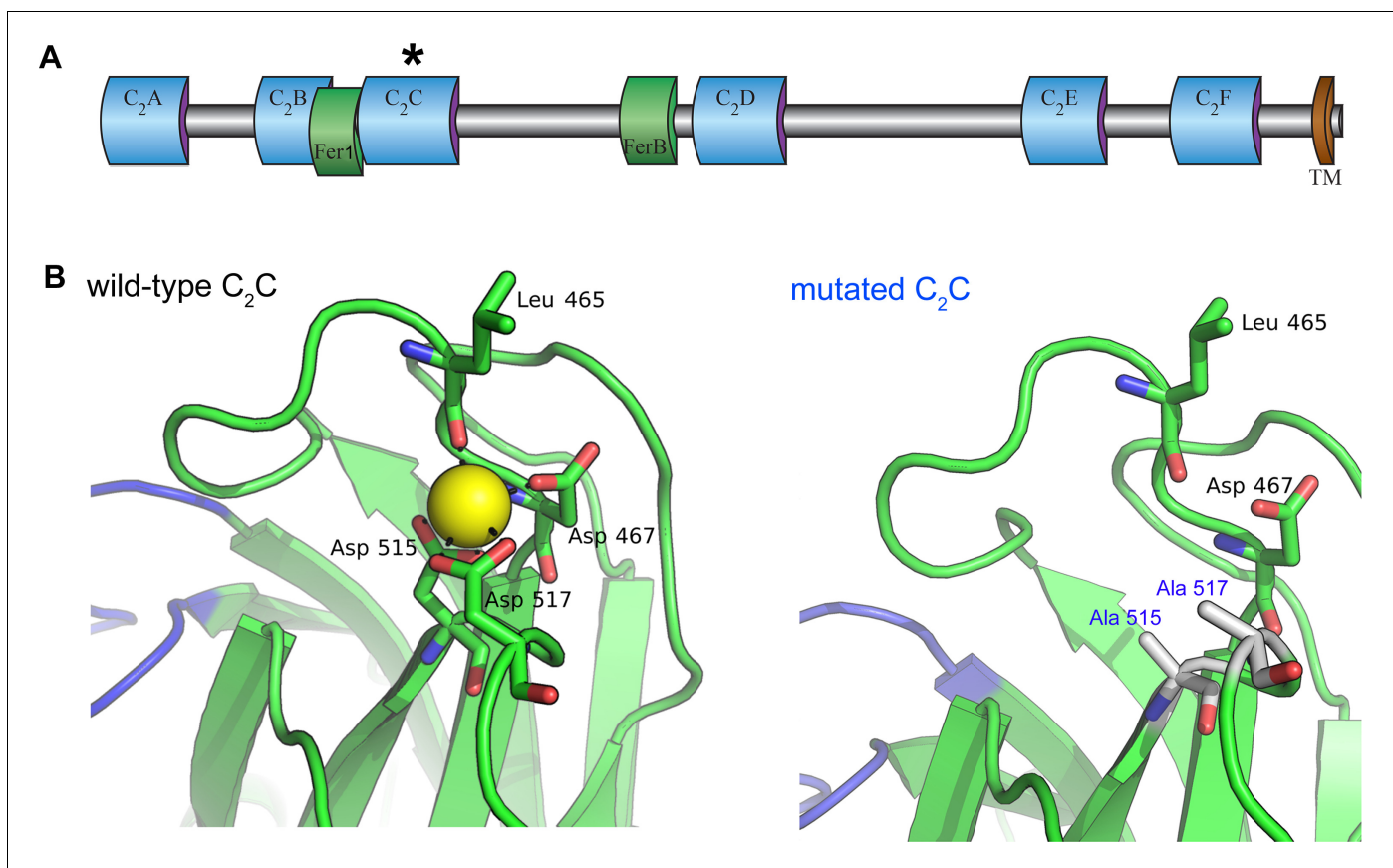
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.001>

## Introduction

The extremely precise encoding of sound temporal features by the first synapse of the mammalian auditory system, that is, between the sensory inner hair cell (IHC) and the primary auditory neuron, is crucial for many perceptive tasks. It is involved in periodicity-pitch detection, prosody cue detection, and sound source localization required for voice and melody identification, speech perception, and auditory scene analysis, respectively (*Schnupp et al., 2011*). Sound-evoked mechanical stimulation of the IHC sensory antenna, the hair bundle, induces changes in membrane potential, modulating synaptic exocytosis with submillisecond precision (*Glowatzki and Fuchs, 2002; Goutman, 2012; Li et al., 2014*). This temporal precision exceeds that for most conventional synapses, and allows sound-evoked action potentials of the primary auditory neurons to be phase-locked to the sinusoidal acoustic signal up to frequencies of ~4 kHz (*Fuchs, 2005; Moser et al., 2006; Safieddine et al., 2012*). In addition, IHCs can maintain neurotransmitter release at high frequency for several minutes (*Kiang, 1965*), which implies a continuous supply of an unusually large number of vesicles to the synaptic active zones. The basolateral region of IHCs contains 10 to 30 synaptic active zones, each of which faces the single dendritic bouton of a primary auditory neuron. Most of the vesicles in each synapse are tethered to a ribbon-shaped osmiophilic structure (hence the name 'ribbon synapse'), presumably forming a pool of primed vesicles for the immediate and sustained replenishment of the pool of fusion-competent vesicles located between the base of the ribbon and the presynaptic plasma membrane (*von Gersdorff and Matthews, 1997; Lenzi et al., 1999; Moser and Beutner, 2000*).

Mature IHCs lack several common synaptic proteins (*Safieddine and Wenthold, 1999; Vogl et al., 2015*). The molecular composition of the exocytosis machinery underlying the functional features of IHC synapses remains largely unknown. In particular, mature IHC synapses lack the synaptic vesicle transmembrane proteins synaptotagmin 1 and 2 (Syt1 and Syt2) (*Safieddine and Wenthold, 1999; Beurg et al., 2010*), which function as  $\text{Ca}^{2+}$  sensors for rapid, synchronous neurotransmitter release at central nervous system synapses (*Südhof, 2013*). These proteins, which contain two cytoplasmic  $\text{C}_2$ -domains, bind to membrane phospholipids in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner (*Brose et al., 1992; Sutton et al., 1995; Wang et al., 2014*), and trigger the final steps of synaptic exocytosis by interacting with complexin and the SNARE molecular complex (*Bennett et al., 1992; Söllner et al., 1993; Li et al., 1995; Giraudo et al., 2006; Südhof, 2013*). However, unlike vesicles of central nervous system synapses, IHC vesicles contain otoferlin, a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding single-pass membrane protein with six  $\text{C}_2$  domains ( $\text{C}_2\text{A-F}$ ) and two Fer domains in its cytoplasmic region (*Yasunaga et al., 1999; Roux et al., 2006; Lek et al., 2010*). Otoferlin belongs to the ferlin family, which is thought to have originated earlier than synaptotagmins and E-synaptotagmins during evolution (*Lek et al., 2012*) (**Figure 1A**). Otoferlin, defective in a recessive form of profound congenital deafness (*Yasunaga et al., 1999; Roux et al., 2006; Lek et al., 2010*), is required for normal synaptic exocytosis in auditory (*Roux et al., 2006*) and vestibular hair cells (*Dulon et al., 2009*). Its role in the hair cell synaptic vesicle cycle remains unclear. IHC synaptic exocytosis is almost entirely abolished in adult mutant mice lacking otoferlin (*Otof*<sup>-/-</sup> mice), despite normal  $\text{Ca}^{2+}$  currents and ribbon synapse morphogenesis (*Roux et al., 2006*). This finding, together with the absence of Syt1, Syt2, and Syt9 from mature IHCs (*Safieddine and Wenthold, 1999; Beurg et al., 2010*), has led to the hypothesis that otoferlin acts as the major  $\text{Ca}^{2+}$  sensor triggering synaptic vesicle fusion with the plasma membrane in the IHC active zone (*Roux et al., 2006*). However, the IHC synapses of *Otof*<sup>-/-</sup> mice being silent, these mice cannot be used to determine in which step(s) of the synaptic vesicle cycle otoferlin exerts its putative  $\text{Ca}^{2+}$  sensing role. The *Pachanga* mutant, a deaf mouse harboring a missense mutation in the otoferlin  $\text{C}_2\text{F}$  domain, showed unaffected vesicle fusion but a major decrease of the sustained component of IHC synaptic exocytosis (*Pangrsic et al., 2010*), which led the authors to suggest a role for otoferlin in synaptic vesicle pool replenishment. However, the  $\text{Ca}^{2+}$  sensing role of otoferlin could not be assessed in the *Pachanga* mice because the mutation does not target a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding site and the otoferlin cell content is much lower than normal. Nevertheless,





**Figure 1.** Homology model of the otoferlin C<sub>2</sub>C domain. (A) Predicted domain structure of the otoferlin protein. Otoferlin is a transmembrane vesicular protein (1997 amino acids in the mouse) consisting of six C<sub>2</sub> domains (C<sub>2</sub>A-F), one Fer1 domain, and one FerB domain (central domains of still unknown function in proteins of the ferlin family) in its extravascular (i.e. cytoplasmic) portion. The asterisk indicates the C<sub>2</sub>C domain targeted for mutagenesis. (B) Ten candidate models were calculated with MODELLER (Webb and Sali, 2014), based on the X-ray structure of the human dysferlin C<sub>2</sub>A domain (4ihb) (Fuson et al., 2014). The primary sequence identity between dysferlin C<sub>2</sub>A and mouse otoferlin C<sub>2</sub>C, assuming type II C<sub>2</sub> domain topology, is 23%. The model with the lowest energy score was selected for analysis. Further refinement was performed with ModRefiner (Xu and Zhang, 2011) using dysferlin C<sub>2</sub>A as the structural reference. At least one Ca<sup>2+</sup> ion (yellow sphere) could be modeled in the C<sub>2</sub>C domain of otoferlin. The position and coordination of this ion within the putative divalent cation binding pocket of the homology model was refined by simulating 20 ns of molecular dynamics using NAMD (Phillips et al., 2005).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.002>

the results obtained in these mice raise the possibility that a deficiency in the dynamics of vesicle pool replenishment explains the synaptic exocytosis defect in *Otof*<sup>-/-</sup> mice, despite their unaffected number of synaptic vesicles at the presynaptic zone (Roux et al., 2006). Of note, *Otof*<sup>4515T/4515T</sup> knock-in mice, harboring a Ile515Thr missense mutation in the C<sub>2</sub>C domain, also display abnormal synaptic exocytosis and sustained release (Strenzke et al., 2016). Similarly to the *Pachanga* mutation, the Ile515Thr mutation does not affect the Ca<sup>2+</sup>-binding site of the C<sub>2</sub> domain, and results in a strongly reduced otoferlin content, again precluding any conclusion regarding a possible Ca<sup>2+</sup> sensing role of otoferlin in synaptic vesicle pool replenishment. Finally, a possible role of otoferlin in synaptic endocytosis and the reformation of correctly sized vesicles has been suggested, based on the *in vitro* interaction between otoferlin and the AP-2 adaptor protein complex involved in clathrin-mediated endocytosis (Duncker et al., 2013), the presence of large abnormal endosome-like vacuoles containing otoferlin in the IHCs of mutant mice lacking AP-2μ (Revelo et al., 2014; Jung et al., 2015), and the presence of enlarged otoferlin-immunoreactive vesicular structures, potentially of endosomal origin, in *Otof*<sup>4515T/4515T</sup> mutant mice (Strenzke et al., 2016).

We sought to identify the step(s) of the synaptic vesicle cycle at which otoferlin may act as a Ca<sup>2+</sup> sensor, by generating a mutant mouse line carrying otoferlin mutations modifying the binding of

Ca<sup>2+</sup> ions to a C<sub>2</sub> domain whilst preserving both protein levels and the ultrastructure of the IHC ribbon synapse. By studying these mice, we were able to demonstrate the Ca<sup>2+</sup> sensing role of otoferlin both in the fusion of synaptic vesicles with the presynaptic membrane and in vesicle pool replenishment.

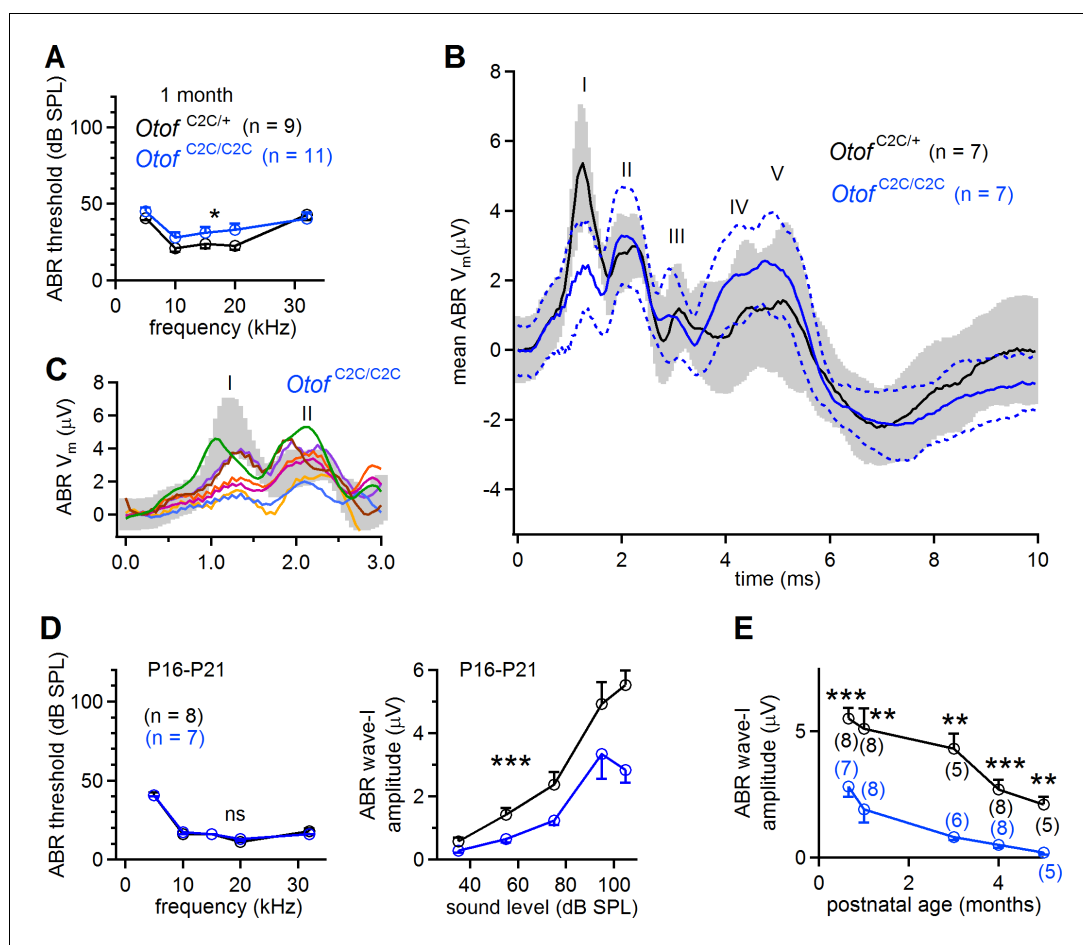
## Results

### Genetic modification of the otoferlin C<sub>2</sub>C domain Ca<sup>2+</sup>-binding site

We investigated the roles of otoferlin in the IHC synaptic vesicle cycle through a mutagenesis strategy similar to that previously used to demonstrate that Syt1 and Syt2 function as Ca<sup>2+</sup> sensors for fast exocytosis, and that Syt7 functions as the Ca<sup>2+</sup> sensor for synaptic facilitation, at central nervous system synapses (Fernández-Chacón *et al.*, 2001; Schneggenburger *et al.*, 2012; Jackman *et al.*, 2016). The Ca<sup>2+</sup>-binding pockets of the Syt C<sub>2</sub>-domains consist of a cluster of conserved aspartic acid residues surrounded by a ring of positively charged residues (Sutton *et al.*, 1995; Shao *et al.*, 1996). Substitution of any of these residues reduces the Ca<sup>2+</sup>-binding affinity of Syt1 and Syt2, decreasing the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of exocytosis, or that of Syt7, eliminating facilitation (Fernández-Chacón *et al.*, 2001; Schneggenburger *et al.*, 2012; Jackman *et al.*, 2016). The otoferlin C<sub>2</sub>A domain does not bind Ca<sup>2+</sup>, but the C<sub>2</sub> B-F domains have sizeable in vitro Ca<sup>2+</sup>-binding affinities (about 13–25 μM) (Johnson and Chapman, 2010). The C<sub>2</sub>C and C<sub>2</sub>F domains have been shown to interact specifically with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PI(4,5)P<sub>2</sub>] in vitro, suggesting a possible role in mediating the preferential membrane targeting of otoferlin (Padmanarayana *et al.*, 2014). In addition, the neutralization of two aspartic acid residues (Asp515 and Asp517) in the otoferlin C<sub>2</sub>C domain has been shown to prevent C<sub>2</sub>C domain-mediated membrane fusion in in vitro assays (Johnson and Chapman, 2010). These results prompted us to target the C<sub>2</sub>C domain for in vivo mutagenesis. Using the crystal structure of the dysferlin C<sub>2</sub>A domain as a template (Fuson *et al.*, 2014), we constructed a homology model of otoferlin C<sub>2</sub>C, to predict the structure of the Ca<sup>2+</sup>-binding site of the C<sub>2</sub>C domain. Otoferlin C<sub>2</sub>C probably folds into a typical type-II C<sub>2</sub> domain. At least one Ca<sup>2+</sup> ion could be bound by three aspartic acid residues (Asp467, Asp515, and Asp517) located on top loops 1 and 3 of the C<sub>2</sub>C domain. The substitution of two of these aspartic acid residues by alanine residues (Asp515Ala and Asp517Ala) is predicted to affect Ca<sup>2+</sup> binding (Figure 1B). We therefore generated a knock-in mouse line carrying these two missense mutations in the homozygous state, *Otof*<sup>Ala515, Ala517/Ala515, Ala517</sup> mice (hereafter referred to as *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> mice), by homologous recombination (see Materials and methods).

### *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> mice have abnormal auditory nerve fiber responses

We first recorded auditory brainstem responses (ABRs), to monitor the electrical response of the primary auditory neurons and the successive neuronal relays of the central auditory pathway to brief sound stimuli, in *Otof*<sup>+/+</sup>, *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/+</sup>, and *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> mice. At the age of one month, ABR thresholds were similar in *Otof*<sup>+/+</sup> (*n* = 5) and *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/+</sup> (*n* = 4) mice (Figure 2—figure supplement 1A, *p* > 0.3), but they were slightly higher in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> mice (*n* = 11), by about 5.4 ± 3.3 dB, on average, than in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/+</sup> mice (*n* = 9), for all frequencies tested (Figure 2A; two-way-ANOVA, *p* = 0.04). Strikingly, the mean peak amplitude for ABR wave-I (in response to 100–200 tone bursts), reflecting the synchronous electrical response of primary afferent neurons, was lower in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> (*n* = 7) than in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/+</sup> mice (*n* = 7), by a factor of 2.7 (Figure 2B–C and E) (*p* = 0.006). This lower ABR wave-I amplitude did not affect ABR waves-II to V, which reflect the mean neuronal activity of the cochlear nucleus and higher auditory relays (Figure 2B). Earlier in development, on postnatal days 16–21 (P16–P21), the ABR thresholds of *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> mice (*n* = 7) were similar to those of *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/+</sup> mice (*n* = 8; Figure 2D; two-way-ANOVA, *p* > 0.2), but the wave-I amplitude was already lower for all sound intensities tested between 35 dB and 105 dB (Figure 2D; two-way-ANOVA, *p* < 10<sup>−4</sup>). From the age of three months onwards, ABR thresholds increased in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> mice (*n* = 5–6) to reach, on average, values 19 ± 5.8 dB higher than those in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/+</sup> mice (*n* = 5; Figure 2—figure supplement 1B; two-way-ANOVA, *p* < 10<sup>−4</sup> for the 3-month-old and 5-month-old mouse groups). The peak amplitude of the ABR wave-I also decreased further by a factor of about 10 (*p* < 0.01, for all ages, with a minimum of 5 animals per group; Figure 2E). By contrast, distortion-product otoacoustic emissions (DPOAEs), which probe outer hair cell (OHC) function, were similar in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/+</sup> (*n* = 5)



**Figure 2.** Smaller amplitude of ABR wave-I in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice. (A) ABR thresholds of one-month-old *Otof*<sup>C2C/+</sup> (black) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> (blue) mice, for pure tone frequencies between 5 kHz and 32 kHz. (B) Mean ABR trace recorded in *Otof*<sup>C2C/+</sup> (black line, n = 7 mice) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> (blue line, n = 7 mice) mice upon a 95 dB SPL (sound pressure level) pure tone stimulation at 10 kHz. The gray area and the area between the blue dotted lines denote the overlapping 95% confidence intervals of the traces recorded in *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice, respectively. (C) Detailed view of ABR wave-I from individual ABR recordings in the *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice, used to calculate the mean traces in B. Each colored trace corresponds to an individual *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mouse. The 95% confidence intervals of the mean traces in (B) are shown in gray for *Otof*<sup>C2C/+</sup> mice. (D) Left: ABR thresholds of P16-P21 *Otof*<sup>C2C/+</sup> (black) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> (blue) mice, for pure tone frequencies between 5 kHz and 32 kHz. Right: Plot of the amplitude of ABR wave-I as a function of sound level for a 10 kHz pure tone. (E) Plot of ABR wave-I amplitude against age (sound at 10 kHz and 105 dB SPL; the numbers indicated in parentheses correspond to the number of mice studied at each age). Data information: In (A, D), data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ns not significant (two-way-ANOVA test). In (B), data are presented as the mean  $\pm$  95% confidence intervals. In (E), data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Student's *t*-test with Welch correction).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.003>

The following figure supplement is available for figure 2:

**Figure supplement 1.** Progressive hearing loss in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice after one month of age.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.004>

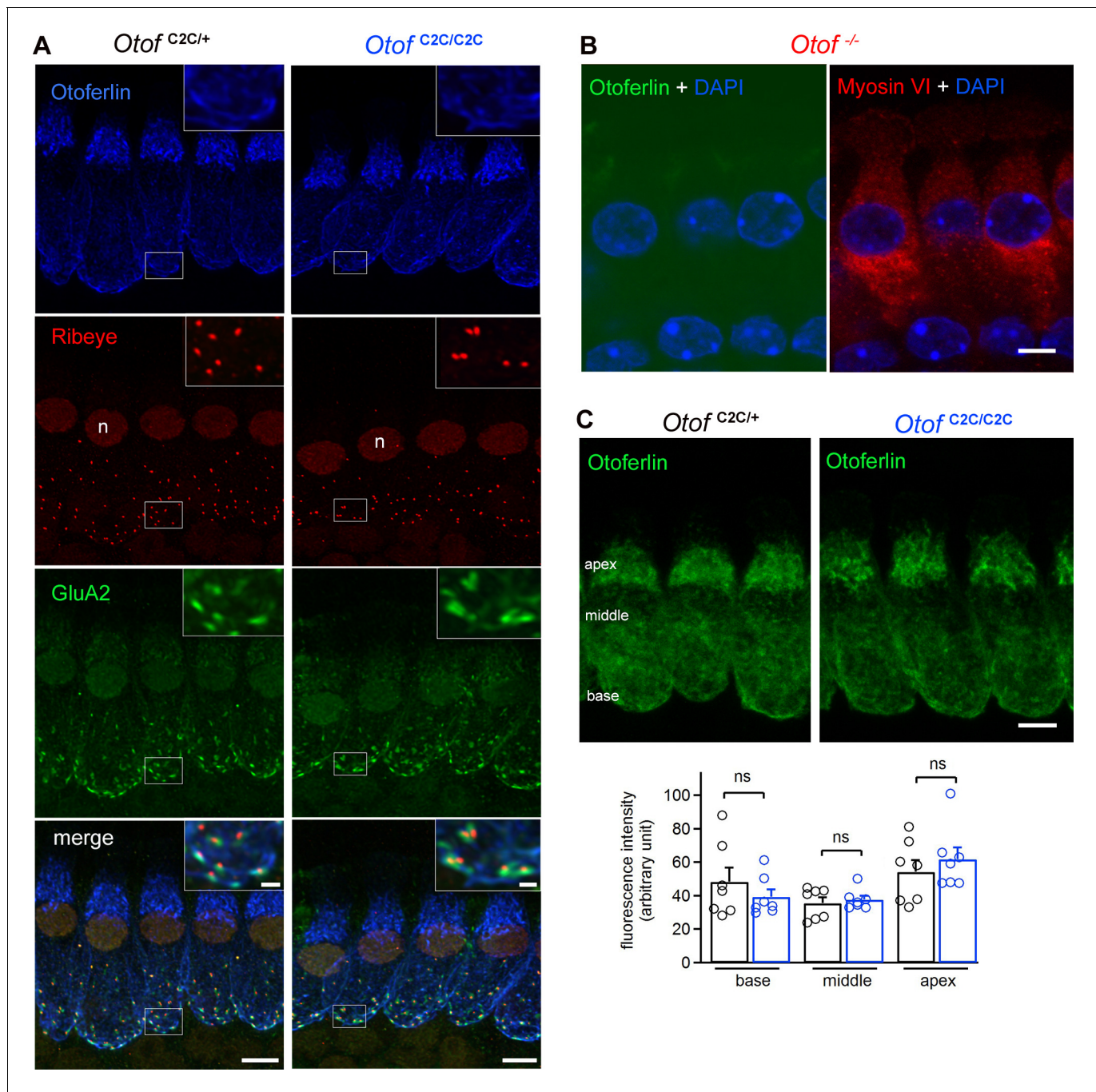
and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> (n = 5–8) mice, in terms of both threshold and amplitude. The cochlear amplification of sound stimuli was, thus, preserved in homozygous mutant mice (**Figure 2—figure supplement 1C**; two-way-ANOVA,  $p = 0.6$  and  $p = 0.1$  for the 1-month-old and 5-month-old mouse groups, respectively). Overall, the auditory phenotype of *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice is consistent with the restriction of otoferlin function to IHCs (Roux et al., 2006), with the decrease in ABR wave-I amplitude suggesting a dysfunction of the ribbon synapses.

## Otof<sup>C2C/C2C</sup> IHCs have normal otoferlin contents and ribbon synapse ultrastructure

We analyzed the IHC ribbon synapses, immunofluorescently labeled for ribeye (a core ribbon protein), the presynaptic L-type Ca<sup>2+</sup> channel Ca<sub>v</sub>1.3, and the postsynaptic glutamate receptor GluA2 (**Figure 3—figure supplement 1**), by confocal microscopy, in *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice on P15-P17 (i.e., a few days after hearing onset). All ribeye-immunoreactive ribbons in *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs displayed Ca<sub>v</sub>1.3 staining systematically apposed to the GluA2 subunit staining. The mean number of ribbons per IHC did not differ significantly between *Otof*<sup>C2C/+</sup> mice (16.4 ± 0.2) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice (16.2 ± 0.2) (63 IHCs from the apical coil of four mice per genotype, p=0.4). In mature IHCs of *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice, otoferlin was detected throughout the cytosol, with intense immunolabeling of the basolateral region containing the ribbon synapses, whereas it was undetectable in the IHCs of *Otof* knockout (*Otof*<sup>-/-</sup>) mice, as previously reported (**Roux et al., 2006**) (**Figure 3A–B**). The immunofluorescence levels of otoferlin at the apex, middle, and base of IHCs were similar between *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice (p>0.3 for all comparisons; **Figure 3C**), indicating that levels of otoferlin expression were unaffected in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs (n = 51 cells from seven mice for each genotype).

We also compared the distributions of immunostaining for otoferlin and the vesicular glutamate transporter Vglut3, imaged at high resolution by stimulated emission depletion microscopy (STED) (**Hell and Wichmann, 1994**). In both *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs, the distance of a given otoferlin immunostaining spot to the closest spot of Vglut3 immunostaining had a different distribution than the distance of a given Vglut3 immunostaining spot from the closest Vglut3 immunostaining spot, with a distinctly smaller mode value (Kolmogorov-Smirnov test, p<10<sup>-8</sup> in the four examples shown in **Figure 3—figure supplement 2**). Moreover, the distributions of the distances between a given otoferlin spot and the closest Vglut3 spot were similar in *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs (Kolmogorov-Smirnov test, p>0.05 in the four examples shown in **Figure 3—figure supplement 2**). This distribution pooled from 7 *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs sections peaked at 124 nm, a value smaller by a factor of 2.3 than the peak of the distribution of nearest neighbor distances between Vglut3 spots (285 nm), and probably corresponding to the resolution of our imaging conditions. These results suggest that otoferlin associates correctly with synaptic vesicles in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs.

We then studied the ultrastructure of IHC ribbon synapses by 3D electron tomography (**Figure 4A**). We reconstructed the ribbon synapses of IHCs located in the cochlear apical turn from seven *Otof*<sup>C2C/+</sup> and ten *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice, on P17 (**Figure 4—video 1,2**). Synaptic vesicles were classified into three different pools, according to their position relative to the presynaptic plasma membrane and the ribbon: (i) ribbon-associated vesicles with centers lying within 40 nm of the presynaptic plasma membrane were classified as the presumptive readily releasable pool (RRP); (ii) vesicles lying within 80 nm of the ribbon but not apposed to the presynaptic plasma membrane were classified as the ribbon-attached pool (RAP), and (iii) vesicles located between 80 nm and 350 nm from the ribbon surface and not apposed to the presynaptic plasma membrane comprised the outlying pool (OP) (**Figure 4A**) (**Lenzi et al., 1999; Kantardzhieva et al., 2013**). In *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> ribbons (n = 10), the RRP, RAP, and OP contained 14.0 ± 0.8, 42.4 ± 5.0, and 32.9 ± 3.6 synaptic vesicles per ribbon synapse, respectively (**Figure 4B**). These values are similar to those previously reported for wild-type mice and other species (**Lenzi et al., 1999; Schnee et al., 2005; Kantardzhieva et al., 2013; Vogl et al., 2015**), and are consistent with the pool sizes we measured in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs (n = 7; RRP, 15.0 ± 0.8; RAP, 41.0 ± 2.8; OP, 33.9 ± 2.0; p>0.4 for each pool). Estimated vesicle densities in the RAP and OP (see Materials and methods) were similar in *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs (**Figure 4C**; p>0.4 for each pool). The mean distance of RRP vesicles from the presynaptic plasma membrane was also similar in *Otof*<sup>C2C/+</sup> (27.8 ± 1.2 nm) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs (24.3 ± 1.4 nm) (**Figure 4D**; p=0.1). However, the mean distance of RAP vesicles from the ribbon was slightly larger in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs (46.6 ± 1.5 nm) than in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs (39.5 ± 1.7 nm) (**Figure 4D**, p<0.01). The normal expression of otoferlin and the well-preserved structure of the ribbon synapse in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs rendered this mouse model suitable for assessment of the roles of otoferlin in vesicle fusion and in synaptic vesicle pool replenishment.



**Figure 3.** Normal expression and subcellular distribution of otoferlin in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. (A) Confocal microscopy images of IHCs from whole-mount preparations of the organ of Corti from P15 *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice triple-labeled for otoferlin (blue), ribeye (red), and postsynaptic GluA2 receptors (green). Insets: detailed views of the boxed synaptic areas. n: cell nucleus. Scale bar: 5  $\mu$ m. Inset scale bar: 1  $\mu$ m. (B) Confocal microscopy image of IHCs from a whole-mount preparation of an organ of Corti from a P15 *Otof*<sup>-/-</sup> mouse triple-labeled for otoferlin (green), the hair cell marker myosin VI (red), and the cell nucleus marker DAPI (blue). Note that the luminosity of the green channel (otoferlin) has been enhanced to show the absence of otoferlin expression in *Otof*<sup>-/-</sup> mice. Scale bar: 5  $\mu$ m. (C) Top: Summed projected z-stack confocal microscopy images of IHCs from whole-mount preparations of organs of Corti from P15 *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice labeled for otoferlin (green). Scale bar: 5  $\mu$ m. Bottom: Quantification of otoferlin fluorescence in *Otof*<sup>C2C/+</sup> (n = 51 cells in 7 mice) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs (n = 51 cells from 7 mice) at the apex, middle, and the base of IHCs. Data information: in (C), data are presented as the mean  $\pm$  SEM. ns, not significant (Student's t-test with Welch correction).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.005>

The following figure supplements are available for figure 3:

**Figure supplement 1.** Normal number of ribbon synapses in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs.

Figure 3 continued on next page

Figure 3 continued

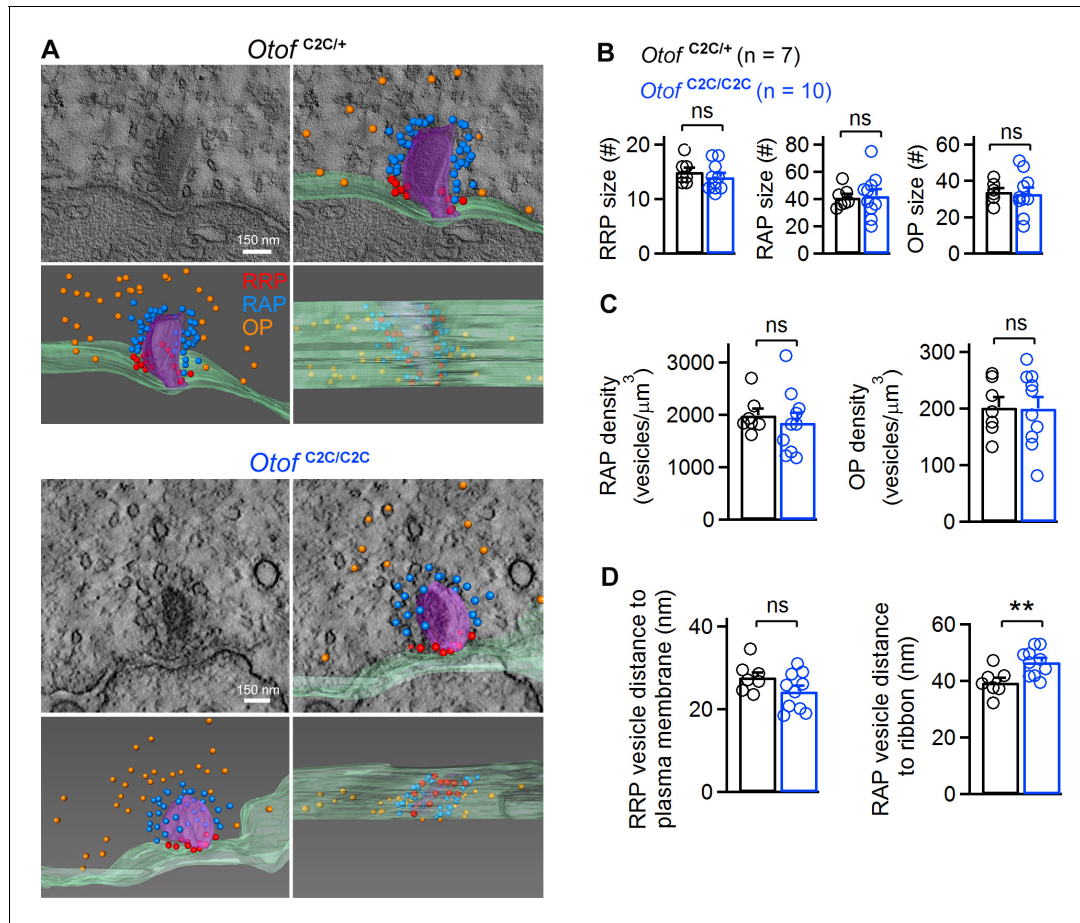
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.006>

**Figure supplement 2.** Normal colocalization of otoferlin and Vglut3 in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.007>

## The Ca<sup>2+</sup> sensitivity of RRP vesicle fusion is affected in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs

Deficient IHC synaptic exocytosis may be due to a failure of synaptic vesicle fusion, vesicle pool replenishment, or endocytosis and synaptic vesicle reformation. We sought to identify the steps of



**Figure 4.** Ultrastructural analysis of the different vesicle pools in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHC ribbon synapses. (A) Representative transmission electron micrographs of ribbon synapses from an *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHC (upper panels) and an *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHC (lower panels). Side views of the electron tomographic reconstruction of *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> ribbon synapses are overlaid on the 3D tomograms. Renderings show the presynaptic plasma membrane (green) relative to the ribbon (purple), vesicles of the presumptive readily-releasable pool (RRP) in red, of the ribbon-associated pool (RAP) in blue, and of the outlying pool (OP) in orange. The ribbon was made semitransparent for visualization of its 3D shape and of the vesicles behind it. (B) Mean numbers of vesicles in the RRP, RAP, and OP of reconstructed *Otof*<sup>C2C/+</sup> (n = 7) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> (n = 10) ribbon synapses. (C) Mean vesicle densities in the RAP and OP of reconstructed *Otof*<sup>C2C/+</sup> (n = 7) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> (n = 10) ribbon synapses. (D) Mean Euclidean distance from RRP vesicle centers to the plasma membrane and from RAP vesicle centers to the ribbon in reconstructed *Otof*<sup>C2C/+</sup> (n = 7) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> (n = 10) ribbon synapses. Data information: In (B–D), data are presented as the mean ± SEM. \*\*p<0.01, ns not significant (Student’s t-test with Welch correction).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.008>

The following videos are available for figure 4:

**Figure 4—video 1.** Example of a ribbon synapse from an *Otof*<sup>C2C/+</sup> mouse reconstructed by electron tomography

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.009>

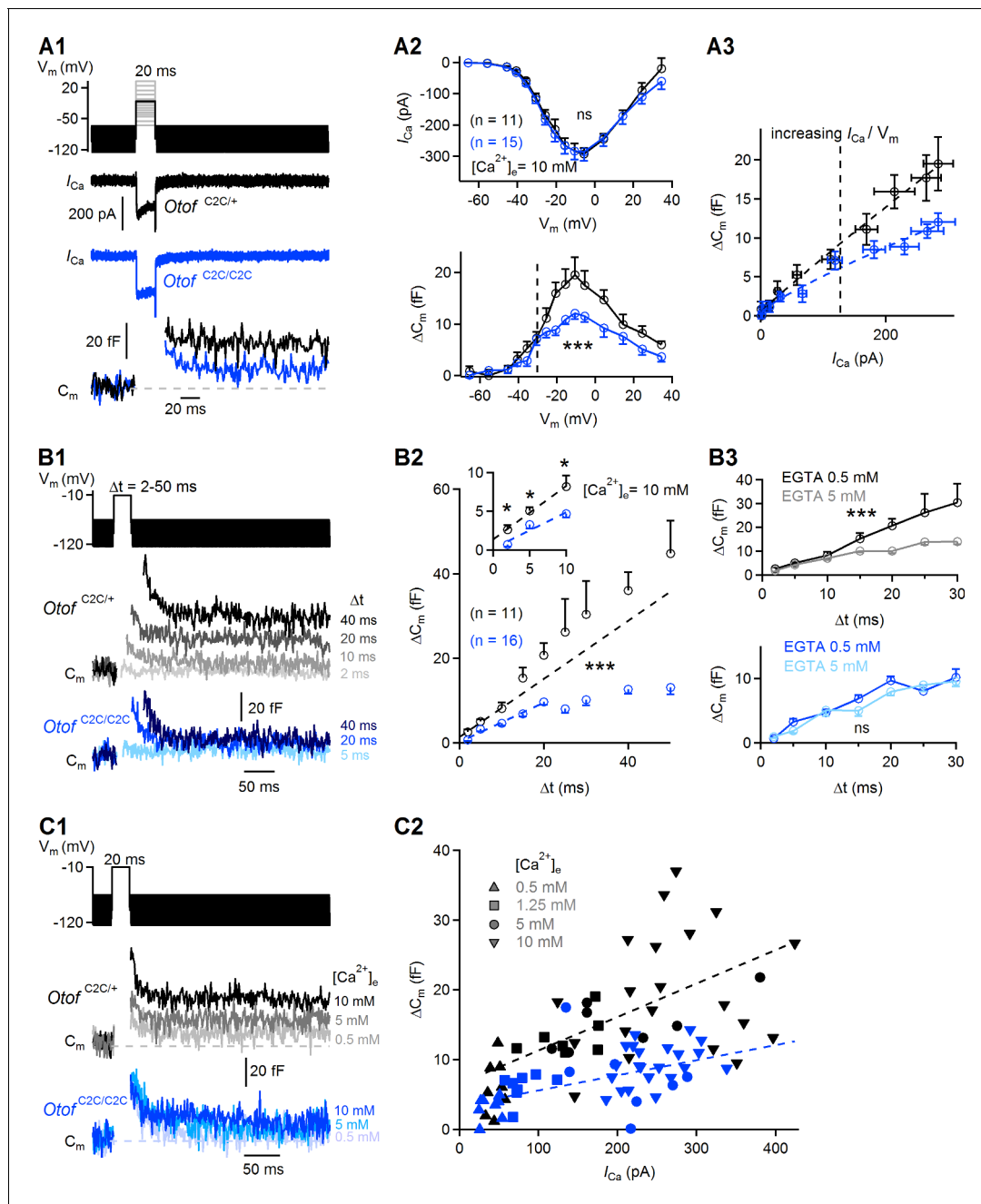
**Figure 4—video 2.** Example of a ribbon synapse from an *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mouse reconstructed by electron tomography

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.010>

the IHC synaptic vesicle cycle affected in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice, by monitoring depolarization-evoked membrane capacitance changes ( $\Delta C_m$ ) in the IHCs of P15-P18 mice, under various conditions of stimulation. We varied  $Ca^{2+}$  influx through the L-type voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels by modifying IHC depolarization level, depolarization duration, or extracellular  $Ca^{2+}$  concentration.

We first measured  $Ca^{2+}$  currents ( $I_{Ca}$ ) and the corresponding  $\Delta C_m$  in response to depolarizations of various amplitudes (from a holding membrane potential of  $-95$  mV to potentials between  $-65$  mV and  $+35$  mV), each lasting 20 ms, during which synaptic exocytosis mostly reflects the fusion of RRP vesicles (**Figure 5A1–A2** and **Figure 5—figure supplement 1A**) (Moser and Beutner, 2000). Plots of  $I_{Ca}$  amplitude as a function of membrane potential were similar between *Otof*<sup>+/+</sup> ( $n = 8$ ) and *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs ( $n = 11$ ; two-way-ANOVA,  $p=0.12$ ), and between *Otof*<sup>C2C/+</sup> ( $n = 11$ ) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs ( $n = 15$ ; two-way-ANOVA,  $p=0.4$ ). The  $I_{Ca}$  plots had the typical inverted bell shape, with a negative peak at around  $-10$  mV (**Figure 5A2**, top and **Figure 5—figure supplement 1B**, top). The corresponding  $\Delta C_m$  also peaked at about  $-10$  mV (**Figure 5A2**, bottom and **Figure 5—figure supplement 1B**, bottom). In *Otof*<sup>+/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs, the evoked  $\Delta C_m$  was identical (two-way-ANOVA,  $p=0.93$ ; **Figure 5—figure supplement 1B**, bottom), and we used *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs as control cells (see Materials and methods). In comparisons of release in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> and *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs, the  $\Delta C_m$  evoked by stepwise depolarization from a holding membrane potential of  $-95$  mV to potentials between  $-65$  mV and  $-30$  mV, characterized by a low opening probability for  $Ca^{2+}$ -channels and a strong  $Ca^{2+}$  influx-driving force, was similar. However, for depolarization to  $-30$  mV and beyond (see dashed line in **Figure 5A2**), corresponding to a high open probability of  $Ca^{2+}$ -channels and a decreasing driving force for  $Ca^{2+}$  entry,  $\Delta C_m$  was significantly smaller in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs than in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs (two-way-ANOVA,  $p<10^{-4}$ ). A 2.5-fold decrease was observed for depolarization to  $-10$  mV. Assuming a membrane capacitance of 45 aF for a single synaptic vesicle (Neef et al., 2007), this corresponds to a difference of 8.3 vesicles/ms in vesicle fusion rate during the 20 ms of depolarization between *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs (21.7 vesicles/ms) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs (13.4 vesicles/ms). We then assessed the  $Ca^{2+}$  efficiency of RRP release, by plotting  $\Delta C_m$  as a function of  $I_{Ca}$  amplitude for depolarization to membrane potentials of  $-65$  mV to  $-10$  mV, corresponding to the falling segment of the  $Ca^{2+}$  current amplitude-voltage ( $I_{Ca}/V_m$ ) curve (**Figure 5A3**), in which  $Ca^{2+}$  currents display minimal contamination with residual unblocked  $K^+$  currents. The  $Ca^{2+}$  efficiency of RRP release, evaluated by plotting the mean derivative of  $\Delta C_m$  against  $I_{Ca}$ , was lower (by a factor of 1.7) in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs ( $(3.9 \pm 0.7) \times 10^{-2}$  fF.pA<sup>-1</sup>) than in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs ( $(6.6 \pm 0.4) \times 10^{-2}$  fF.pA<sup>-1</sup>) (fitted slope  $\pm 95\%$  confidence interval).

We investigated the role of otoferlin in the kinetics of RRP synaptic vesicle fusion further, by analyzing the  $\Delta C_m$  elicited by brief depolarizations, of 2 to 50 ms duration, to  $-10$  mV (**Figure 5B1**), first in low intracellular  $Ca^{2+}$ -buffering conditions with an intracellular solution containing 0.5 mM EGTA. The presence of a vesicle fusion defect per se, independent of vesicle pool replenishment, could be inferred from the  $\Delta C_m$  evoked by very short IHC depolarizations ( $<10$  ms) (**Figure 5B2**). For depolarizations of 2 and 5 ms, the  $\Delta C_m$  values in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice ( $n = 16$ ) were about a third ( $p=0.01$ ) and a half ( $p=0.02$ ) those in *Otof*<sup>C2C/+</sup> mice ( $n = 11$ ), respectively, indicating a direct effect of the C2C domain mutations on vesicle fusion. By fitting the average relationship between  $\Delta C_m$  and depolarization duration ( $\Delta t$ ) for the shortest depolarizations, we found that the slope of this fit, taken as an approximation of the  $Ca^{2+}$  sensitivity of release, was lower (by a factor of 1.5) in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs ( $0.46 \pm 0.04$  fF.ms<sup>-1</sup>) than in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs ( $0.69 \pm 0.05$  fF.ms<sup>-1</sup>) (**Figure 5B2**; fitted slope  $\pm 95\%$  confidence interval). This result again suggests that C2C domain mutations substantially decrease the  $Ca^{2+}$ -sensitivity of RRP vesicle fusion. We verified that the low vesicle fusion rate in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs was not due to a looser coupling of  $Ca^{2+}$  channels with the release sites, by patch-clamping a subset of IHCs with an intracellular solution containing 5 mM EGTA, a high buffer concentration reported to limit intracellular  $Ca^{2+}$  diffusion from its entry point, thereby reducing the fusion of vesicles lying more than a few tens of nm away from  $Ca^{2+}$  channels (Moser and Beutner, 2000; Spassova et al., 2004; Brandt et al., 2005; Levic et al., 2011) (**Figure 5B3**). In *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs, RRP release at intracellular EGTA concentrations of 0.5 mM ( $n = 11$ ) and 5 mM ( $n = 9$ ) was similar for depolarization durations between 2 and 10 ms, reflecting a tight coupling of  $Ca^{2+}$  channels to RRP vesicles (**Figure 5B3**, top, two-way-ANOVA,  $p=0.3$  for the 2–10 ms interval and  $p=3 \times 10^{-4}$  for the 2–30 ms interval). In *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs, RRP release at intracellular EGTA concentrations of 0.5 mM ( $n = 16$ ) and 5 mM ( $n = 10$ ) was also similar for depolarization durations between 2 and 10 ms (**Figure 5B3**, bottom; two-way-ANOVA,  $p=0.2$  for the 2–30 ms interval), suggesting that the spatial



**Figure 5.**  $\text{Ca}^{2+}$ -dependence of the RRP vesicle fusion defect in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. (A1) Protocol used to depolarize IHCs from  $-95$  mV to potentials between  $-65$  to  $+35$  mV (top). Examples of  $\text{Ca}^{2+}$  currents ( $I_{\text{Ca}}$ ) (middle) and corresponding  $C_m$  traces (bottom) for P15-P18 *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs after 20 ms of depolarization to  $-10$  mV. (A2) Mean  $\text{Ca}^{2+}$  current amplitudes ( $I_{\text{Ca}}$ ) (top) and  $\Delta C_m$  (bottom) for P15-P18 *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs after 20 ms of depolarization to potentials between  $-65$  mV to  $+35$  mV. The vertical dashed line indicates the  $-30$  mV voltage point. (A3) Mean  $\Delta C_m$  values plotted against the  $\text{Ca}^{2+}$  currents elicited by depolarizing steps to potentials underlying the falling segment of the  $I_{\text{Ca}}/V_m$  curve ( $-65$  mV to  $-10$  mV), corresponding to increasing  $\text{Ca}^{2+}$  currents. The vertical dashed line indicates the  $-30$  mV voltage point. The *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup>  $\Delta C_m$  data were fitted with a power function, yielding an exponent of 0.94 and 0.83, respectively. (B1) Protocol used to depolarize IHCs from  $-95$  mV to  $-10$  mV for voltage steps of different durations from 2 ms to 50 ms (top). Corresponding example  $C_m$  traces from P15-P18 *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs (bottom). The example traces for each genotype come from the same patch-clamped IHC. (B2) Kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis in P15-P18 *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs for voltage steps of 2 ms to 50 ms. Mean  $\Delta C_m$  is plotted against the duration of the depolarization to  $-10$  mV ( $\Delta t$ ). The inset shows the detail for  $\Delta t$  values between 2 ms and 10 ms. For the 2 ms and 5 ms depolarizations, five repetitions of the recordings were averaged, to increase the signal-to-noise ratio. The decrease in  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity of RRP vesicle fusion was evaluated by fitting the  $\Delta C_m$  versus  $\Delta t$  plots with a line for  $\Delta t$  between 2 and 10 ms in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs and for  $\Delta t$  between 2 and 20 ms in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. The *Otof*<sup>C2C/+</sup> fit was plotted for durations greater than 10 ms, to illustrate the onset of the second component of release corresponding to the initiation of vesicle pool replenishment. (B3) We

Figure 5 continued on next page



Figure 5 continued

evaluated the coupling of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels to RRP vesicles, by setting the intracellular EGTA concentration to 5 mM in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs (gray,  $n = 9$ ) and in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs (light blue,  $n = 10$ ). The data for an intracellular EGTA concentration of 0.5 mM are as in (B2). (C1) Protocol used to depolarize IHCs from  $-95$  mV to  $-10$  mV for 20 ms with different extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations (top). Example  $C_m$  traces from P15-P18 *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs for different extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations (bottom). Each example  $C_m$  trace for a given genotype was obtained from a different IHC. (C2)  $\Delta C_m$  values plotted against the  $\text{Ca}^{2+}$  currents elicited at different extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ) in *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> P15-P18 IHCs. Dashed lines show linear fits to the data. Data information: In (A2, B2–B3), data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0.001$ , ns not significant (two-way-ANOVA). In (B2, inset), \* $p < 0.05$  (Student's  $t$ -test with Welch correction). In A1, example  $\text{Ca}^{2+}$  traces are corrected for linear leak conductance, leading to a subtraction of the sinusoidal signal. In (A1, B1, C1), the raw  $C_m$  traces are shown.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.011>

The following figure supplement is available for figure 5:

**Figure supplement 1.**  $\text{Ca}^{2+}$ -dependence of RRP vesicle fusion is normal in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.012>

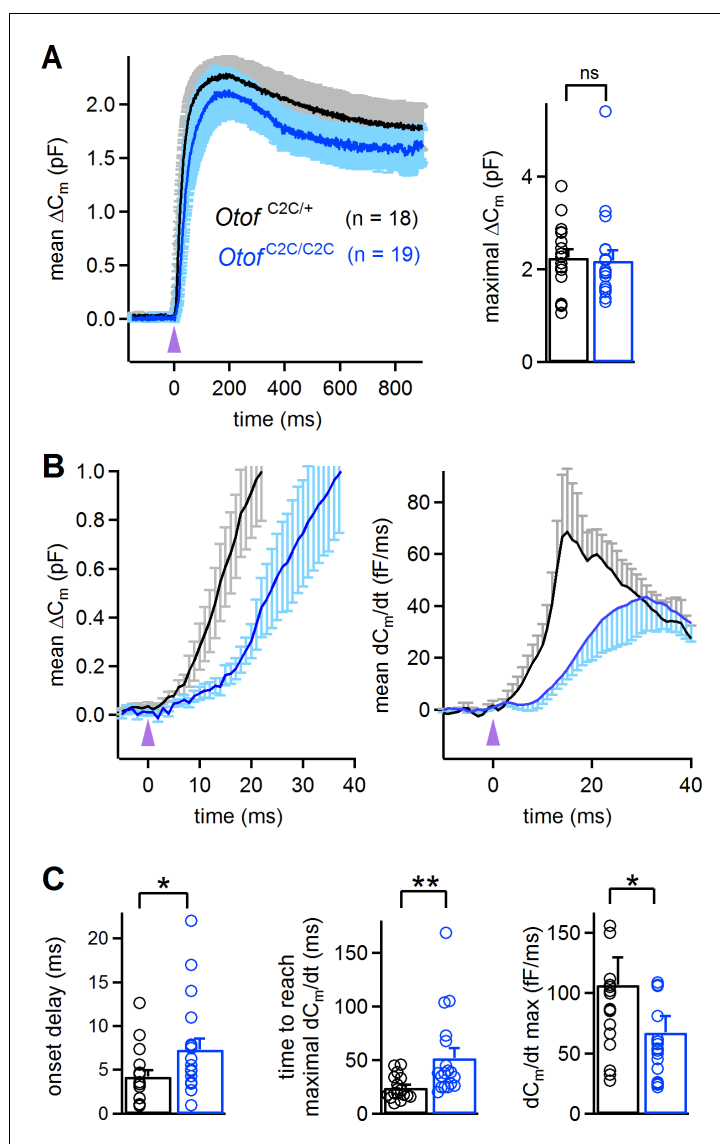
coupling between voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels and RRP vesicles is not modified by otoferlin C<sub>2</sub>C domain mutations. Remarkably, unlike the exocytotic response of *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs, which did not plateau for depolarizations lasting up to 50 ms, that of *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs rapidly saturated for depolarizations lasting 15–20 ms (Figure 5B2), and was insensitive to 5 mM intracellular EGTA (Figure 5B3), suggesting that vesicle pool replenishment at the release sites was also impaired in these cells.

We then characterized the defect in  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity by varying the amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  entry through the voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels using a set of different extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations ( $[\text{Ca}^{2+}]_e = 0.5$  mM, 1.25 mM, 5 mM, 10 mM) during depolarizations of the IHCs for 20 ms to  $-10$  mV (Figure 5C1). Similar maximal voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  currents were obtained, ranging from  $45 \pm 3$  pA ( $[\text{Ca}^{2+}]_e = 0.5$  mM) to  $268 \pm 18$  pA ( $[\text{Ca}^{2+}]_e = 10$  mM) in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs ( $n = 43$ ) and from  $40 \pm 4$  pA ( $[\text{Ca}^{2+}]_e = 0.5$  mM) to  $246 \pm 9$  pA ( $[\text{Ca}^{2+}]_e = 10$  mM) in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs ( $n = 47$ ;  $p > 0.2$  for both comparisons). However, for any given level of  $\text{Ca}^{2+}$  current, synaptic release in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs was only about half that in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs. Moreover, the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of release, evaluated by fitting a linear function to the  $\Delta C_m/I_{Ca}$  curve, was lower (by a factor of 2.2) in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs ( $(2.2 \pm 0.5) \times 10^{-2}$  fF.pA<sup>-1</sup>) than in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs ( $(4.8 \pm 1.0) \times 10^{-2}$  fF.pA<sup>-1</sup>) (Figure 5C2; fitted slope  $\pm 95\%$  confidence interval). Together, these results support the notion that C<sub>2</sub>C domain mutations decrease the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent efficiency and kinetics of RRP vesicle fusion.

### Vesicle release in response to intracellular $\text{Ca}^{2+}$ uncaging is delayed and slower in *otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs

We studied the  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of the C<sub>2</sub>C-mutated otoferlin independently of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels, by monitoring  $\Delta C_m$  upon intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging, using a single high-energy UV flash delivered to P14-P16 IHCs loaded with  $\text{Ca}^{2+}$ -saturated DM-nitrophen (Heidelberger et al., 1994; Beutner et al., 2001; Vincent et al., 2014). This protocol, which triggered a rapid and global increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, from a few tens of nM to up to  $59 \pm 7$   $\mu\text{M}$  ( $n = 7$ ) (Vincent et al., 2015), led to a total synaptic release that was similar in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs ( $2.25 \pm 0.18$  pF;  $n = 18$ ) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs ( $2.19 \pm 0.22$  pF;  $n = 19$ ; Mann-Whitney test,  $p = 0.4$ ; Figure 6A), corresponding to about 50 000 vesicles for both genotypes. This result suggests that all the vesicles in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs can fuse when exposed to high  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations throughout the entire vesicle cycle pathway. We then analyzed the kinetics of  $\Delta C_m$  in the first few milliseconds after the UV flash in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. The most striking features were the delayed onset of synaptic release and the longer time required to reach the maximal rate of release in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs ( $7.3 \pm 1.2$  ms and  $52.1 \pm 9.2$  ms, respectively) than in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs ( $4.2 \pm 0.7$  ms and  $24.3 \pm 2.7$  ms, respectively; Mann-Whitney test,  $p = 0.02$  and  $p = 0.001$ , respectively; Figure 6B–C). The maximal rate of release was also lower (by a factor of 1.6) in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs ( $67 \pm 14$  fF.ms<sup>-1</sup>, corresponding to  $1490 \pm 310$  vesicles/ms) than in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs ( $107 \pm 23$  fF.ms<sup>-1</sup>, corresponding to  $2380 \pm 510$  vesicles/ms; Mann-Whitney test,  $p = 0.03$ ; Figure 6C).

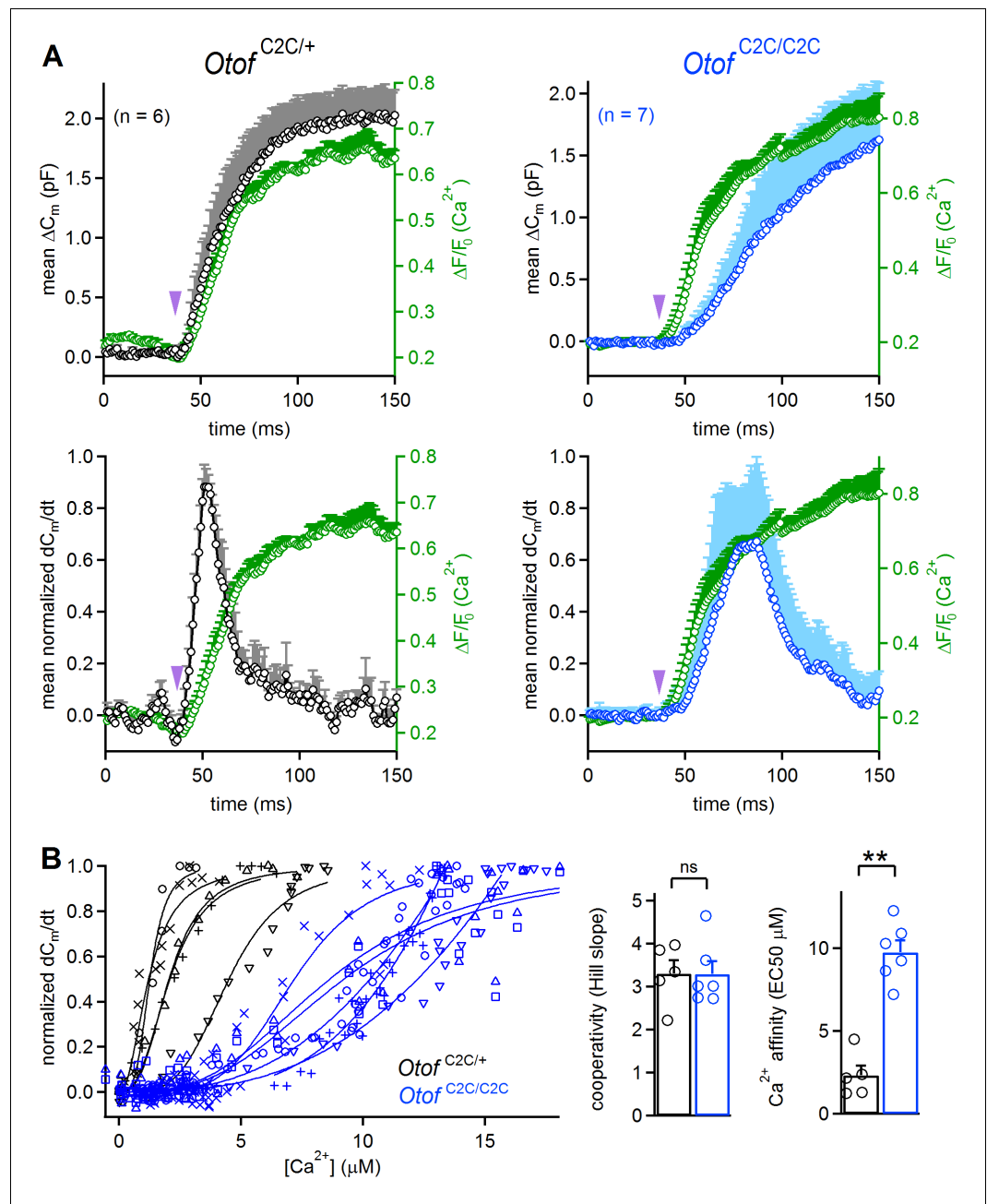
We estimated the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of vesicle fusion in *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs, by simultaneously monitoring  $\Delta C_m$  and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  variations in IHCs loaded with the low-affinity fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$ -indicator Oregon Green BAPTA 5N (OGB-5N) (Figure 7A). The use of the long-wavelength excitation dye (488 nm) OGB-5N allowed continuous fast monitoring of the  $\text{Ca}^{2+}$  signal



**Figure 6.** Abnormal kinetics of exocytosis evoked by intracellular  $Ca^{2+}$  uncaging in  $Otof^{C2C/C2C}$  IHCs. (A) Left: Mean  $\Delta C_m$  response curves in P14-P16  $Otof^{C2C/+}$  and  $Otof^{C2C/C2C}$  IHCs after a single UV flash (purple arrowhead) uncaging intracellular  $Ca^{2+}$ . Right: Bar graph showing mean and individual maximal  $\Delta C_m$  values. (B) Left: Close-up of the wave shown in A, focusing on the first 40 ms after the UV flash (purple arrowhead). Right: Mean time derivative of the  $C_m$  response curves in the first 40 ms following the UV flash. (C) Bar graphs of the mean and individual onset delay of the  $\Delta C_m$  (left), time taken to reach the maximal release rate (middle), and time derivative of release (right) in  $Otof^{C2C/+}$  (n = 18) and  $Otof^{C2C/C2C}$  (n = 19) IHCs. Data information: in (A–C), data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ns not significant (Mann-Whitney test).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.013>

under confocal microscopy in IHCs (line scan at 1 kHz), no photolysis of DM-nitrophen being triggered by visible-light excitation at 488 nm (Vincent et al., 2014). In these recording conditions, the kinetics of the intracellular  $Ca^{2+}$  increase in  $Otof^{C2C/+}$  ( $t = 28.8 \pm 1.7$  ms;  $n = 6$ ) and  $Otof^{C2C/C2C}$  IHCs ( $26.6 \pm 9.2$  ms;  $n = 7$ ) upon UV flash were similar ( $p = 0.8$ ), whereas the peak exocytosis rate occurred later in  $Otof^{C2C/C2C}$  IHCs than in  $Otof^{C2C/+}$  IHCs in agreement with the first set of  $Ca^{2+}$  uncaging experiments (Figures 6A and 7A). We estimated the cooperativity and  $Ca^{2+}$  sensitivity of synaptic release in  $Otof^{C2C/+}$  and  $Otof^{C2C/C2C}$  IHCs, by fitting the relationship between the rate of exocytosis and the quantitatively calibrated fluorescent  $Ca^{2+}$  signal for each cell with a Hill equation (Figure 7B, left). No major effect on the cooperativity of release was detected in  $Otof^{C2C/C2C}$  IHCs



**Figure 7.** Reduced  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity of exocytosis in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. (A) Mean  $\Delta C_m$  response curves (top) and normalized exocytosis rates ( $dC_m/dt$ ) (bottom), with mean intracellular fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  signals of OGB-5N (green traces) recorded simultaneously after  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging (purple arrowhead) in P14-P16 *Otof*<sup>C2C/+</sup> (in black) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> (in blue) IHCs. (B) Left: For each recorded *Otof*<sup>C2C/+</sup> (in black) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> (in blue) IHC, the rate of exocytosis was plotted as a function of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , and each data set was fitted with a Hill function  $y = V_{\text{max}} \cdot x^n / (\text{EC}_{50}^n + x^n)$ . Right: Mean cooperativity and  $\text{Ca}^{2+}$ -affinity of release in *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. Note that for 3 out of 6 *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs, the fit of the sigmoidal Hill function to the data was only partial. For those IHCs, the  $\text{Ca}^{2+}$  affinity was estimated as the value of  $[\text{Ca}^{2+}]$  for which  $dC_m/dt = 0.5$ , rather than the  $\text{EC}_{50}$  of the fitted Hill function, which was larger. Data information: in (B), one IHC of each genotype was removed because of the lack of experimental points for a reliable fitting with a Hill function. In (A–B), data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$ , ns not significant (Mann-Whitney test).

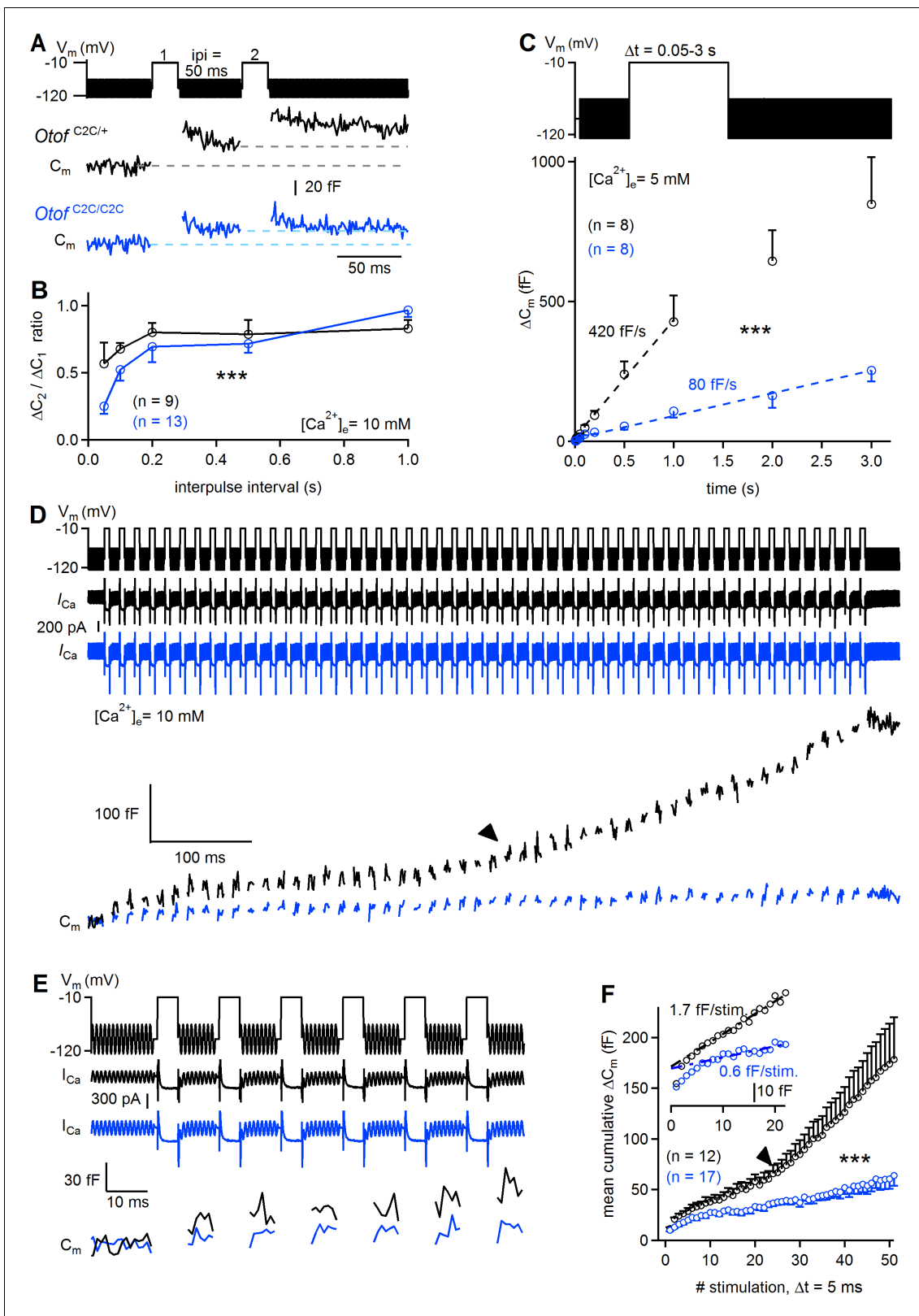
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.014>

(Hill coefficient value:  $3.3 \pm 0.3$  for both genotypes;  $p > 0.9$ ; **Figure 7B**), whereas the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of vesicle fusion was about four times lower in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs (EC50:  $9.8 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ) than that in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs (EC50:  $2.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$ ;  $p = 0.004$ ; **Figure 7B**). Taking into account the normal number of docked vesicles in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs (**Figure 4**) and the lower efficiency of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis following the activation of their  $\text{Ca}^{2+}$  channels (**Figure 5 C1–C2**), these  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging results are consistent with a deleterious effect of C<sub>2</sub>C domain mutations on the  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of otoferlin for triggering and setting the rate of RRP vesicle fusion.

### The $\text{Ca}^{2+}$ dependence of synaptic vesicle pool replenishment is affected in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs

It has been suggested that vesicle pool replenishment is otoferlin-dependent at the IHC ribbon synapse (**Pangrsic et al., 2010**), and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent thereafter (**Schnee et al., 2011b**; **Levic et al., 2011**). This prompted us to investigate the possible role of otoferlin as a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor for synaptic vesicle pool replenishment. We first determined the extent to which RRP replenishment was affected in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs, by performing paired-pulse experiments, using 20 ms-long pulses with various intervals between stimuli (**Figure 8A–B**). The paired-pulse ratio of release, used as a proxy for RRP replenishment, was much lower (by a factor of 2.2 at its minimum value) in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs ( $n = 13$ ) than in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs ( $n = 9$ ), for interpulse intervals of up to 500 ms (two-way ANOVA,  $p < 10^{-4}$ ). This result led us to conclude that the impairment of sustained release in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs is not merely a consequence of impaired RRP release; the recruitment of synaptic vesicles per se is also defective. However, the paired-pulse ratio recovered fully at interpulse intervals of about 1 s. We probed the response of *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs ( $n = 8$ ) to long depolarizations to  $-10$  mV of up to 3 s and observed a much lower (by a factor of 5.3) rate of exocytosis than that measured in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs ( $n = 8$ ; 80 fF/s versus 420 fF/s; two-way ANOVA,  $p < 10^{-4}$ ; **Figure 8C**).

We characterized the kinetics of synaptic vesicle pool replenishment further, by subjecting *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs to periodic stimulation with 50 short (5 ms long) depolarizations to  $-10$  mV, separated by 10 ms intervals (**Figure 8D–E**). This periodic stimulation induced a mean  $\Delta C_m$  of 51 fF in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs (**Figure 8F**). This value exceeding that for RRP depletion ( $\sim 20$  fF), indicates the occurrence of vesicle pool replenishment. Assuming full depletion of the RRP by the train of depolarizations, we can estimate the rate of vesicle pool replenishment at about 1.5 vesicles/ms/IHC in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs, a much lower value (by a factor of 3.7) than obtained for *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs ( $\sim 5.6$  vesicles/ms/IHC). The time course of synaptic exocytosis in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs during the train of successive depolarizations (**Figure 8D–F**) had three kinetic components, as previously described (**Schnee et al., 2011b**): a rapid depletion of the RRP during the first two to three stimulations, followed by a linear release component between the 3rd and 23rd (approximately) stimulation, with a superlinear release component beyond the 23rd stimulation. The linear release component has been suggested to reflect  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent replenishment of the fusion site by vesicles from the recycling pool (**Rizzoli and Betz, 2005**), possibly corresponding to RAP vesicles, and the superlinear component observed at high  $\text{Ca}^{2+}$  loads to reflect additional vesicle replenishment from the reserve pool, possibly involving OP vesicles transported to release sites by a mechanism dependent on  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release (**Schnee et al., 2011b**; **Castellano-Muñoz et al., 2016**). The linear replenishment component was less efficient (by a factor of 2.8) in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs ( $n = 17$ ) than in *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs ( $n = 12$ ), at 0.6 fF and 1.7 fF per depolarization step, respectively. The onset of the superlinear release component has been shown to be  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent (**Schnee et al., 2011b**). In *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs, superlinear release was observed in only one of seventeen *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs subjected to such trains of depolarization, whereas it was observed in six of the twelve *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs studied and six of the eleven *Otof*<sup>+/+</sup> IHCs studied (Fisher's exact test,  $p = 0.01$ ). This almost total absence of superlinear release in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs was probably unlinked to intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion defects, because the patterns of calcium entry and diffusion imaged by high-speed swept-field confocal microscopy in IHCs loaded with OGB-5N were similar in *Otof*<sup>C2C/+</sup> ( $n = 10$ – $12$ ) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs ( $n = 6$ – $10$ ). Thus, the C<sub>2</sub>C domain mutations did not affect the temporal and spatial dynamics of  $\text{Ca}^{2+}$  entry and diffusion around the synaptic ribbon (**Figure 8—figure supplement 1**). These results suggest that otoferlin may also function as the  $\text{Ca}^{2+}$  sensor triggering superlinear release.



**Figure 8.** Reduced sustained release in  $Otof^{C2C/C2C}$  IHCs. (A) Paired-pulse stimulation protocol, showing two consecutive 20 ms depolarizations from a holding potential of -95 mV to -10 mV (top), and example  $C_m$  traces from  $Otof^{C2C/+}$  and  $Otof^{C2C/C2C}$  IHCs (bottom). (B) Mean  $\Delta C_m$  ratio for the second depolarization relative to the first depolarization ( $\Delta C_2 / \Delta C_1$ ) as a function of interpulse interval (ipi = 50, 100, 200, 500, and 1000 ms), for P15-P18  $Otof^{C2C/+}$  and  $Otof^{C2C/C2C}$  IHCs. (C) Kinetics of  $Ca^{2+}$ -dependent exocytosis for single depolarizations to -10 mV lasting between 50 ms and 3 s in Figure 8 continued on next page

Figure 8 continued

P15-P18 IHCs. Mean  $\Delta C_m$  values are plotted as a function of depolarization duration ( $\Delta t$ ), together with linear fits for *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. These recordings were carried out with an extracellular solution containing 5 mM  $Ca^{2+}$ . (D) Protocol used to elicit a train of 50 successive short depolarizations (duration 5 ms, interpulse interval 10 ms) to  $-10$  mV (top). Example  $I_{Ca}$  (middle) and corresponding  $C_m$  traces (bottom) in *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. Note the transition between the linear and superlinear components of release for the *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHC (arrowhead). (E) Expanded view of the first 100 ms in D. (F) Plots of mean cumulative  $\Delta C_m$  as a function of stimulus number in response to the train of 50 successive short depolarizations in *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> P15-P18 IHCs. For each depolarization,  $\Delta C_m$  was evaluated in this particular case by averaging only the last 3 ms of the  $C_m$  values of each interstimulus interval to prevent contamination by the initial peaks. Note the transition from the linear component to a superlinear component of release for *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs (arrowhead). The inset is a magnification of the first 20 depolarizations, with linear fits to  $\Delta C_m$  during successive depolarizations for *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. Data information: in (B–C, F), data are presented as the mean  $\pm$  SEM.

\*\*\* $p < 0.001$  (two-way-ANOVA). In (A, D, E) raw  $C_m$  traces are shown. In (D, E) the  $C_m$  transient change following each depolarization has been blanked for the sake of clarity. In (D), the example  $I_{Ca}$  traces were not corrected for the linear leak conductance, leaving the sinusoidal  $I_{Ca}$  component apparent.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.015>

The following figure supplement is available for figure 8:

**Figure supplement 1.** Normal  $Ca^{2+}$  entry, assessed by high-speed two-dimensional  $Ca^{2+}$  imaging, in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs.

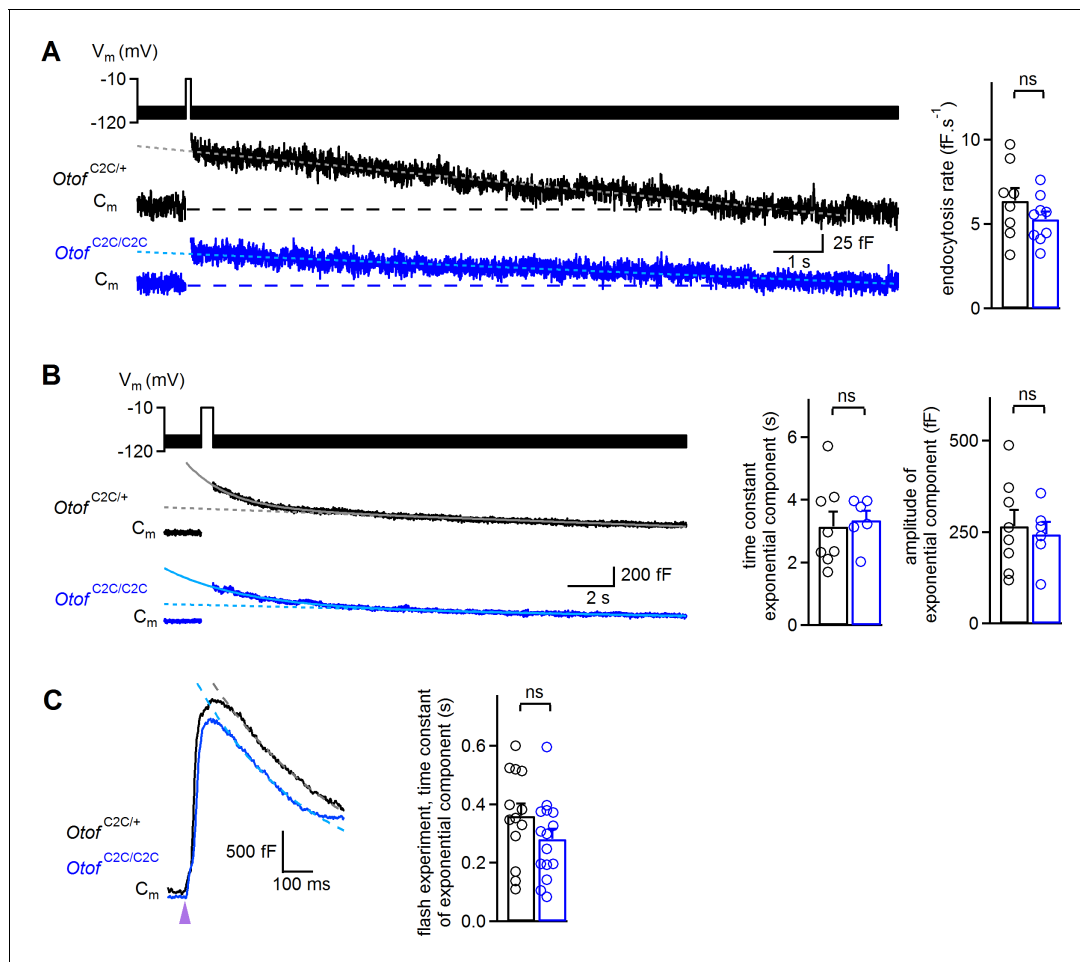
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.016>

### Endocytosis is normal in *otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs

It has also been suggested that otoferlin is involved in endocytosis (Duncker et al., 2013) and synaptic vesicle reformation (Strenzke et al., 2016). We therefore investigated endocytosis in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs, because a possible defect of endocytosis might account for the low rates of vesicle pool replenishment. In wild-type ribbon synapses, two modes of membrane retrieval following IHC depolarization, with different kinetics, have been described: a slow one involving linear  $C_m$  decline upon short depolarizations (typically  $< 50$  ms in our recording conditions) and a fast one with an exponential decline upon longer depolarizations (typically  $> 100$  ms) (Moser and Beutner, 2000; Beutner et al., 2001; Neef et al., 2014). In *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs, both these modes of endocytosis were observed (Figure 9A–B and Figure 9—figure supplement 1). However, a 100 ms depolarization was sufficient to observe the exponential component of endocytosis in seven of the eight *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs studied, but the same protocol elicited the exponential component in only one of the 10 *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs recorded (Fisher's exact test,  $p = 0.003$ ). Increasing the duration of depolarization to 200–500 ms increased this proportion to six of the ten recorded *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. We therefore compared the slow and rapid endocytotic components between *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs with similar preceding exocytosis levels. In IHCs for which values of 20 to 150 fF had previously been recorded for exocytosis, the rate of the slow component was similar in *Otof*<sup>C2C/+</sup> ( $6.4 \pm 0.8$  fF $\cdot$ s<sup>-1</sup>,  $n = 8$ ) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs ( $5.3 \pm 0.5$  fF $\cdot$ s<sup>-1</sup>,  $n = 9$ ;  $p = 0.24$ ; Figure 9A) and the  $C_m$  traces systematically returned to the baseline  $C_m$  value within 30 s after IHC depolarization. Likewise, when considering IHCs with an amplitude of the exponential component of endocytosis exceeding 100 fF, the time constant and amplitude of the exponential component of endocytosis were similar in *Otof*<sup>C2C/+</sup> ( $3.2 \pm 0.5$  s and  $266 \pm 44$  fF, respectively,  $n = 8$ ) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs ( $3.4 \pm 0.3$  s and  $244 \pm 34$  fF, respectively,  $n = 6$ ;  $p > 0.7$  for both comparisons; Figure 9B), but the  $C_m$  traces rarely reached the baseline  $C_m$  value within 30 s after IHC depolarization. Finally, we further analyzed the  $\Delta C_m$  measurements following a UV-flash. Upon  $Ca^{2+}$  uncaging, the exocytotic peak was followed by a fast decline in  $C_m$  that was probably due to endocytotic membrane retrieval, as previously described (Beutner et al., 2001). In these experimental conditions, endocytosis kinetics were also similar in *Otof*<sup>C2C/+</sup> ( $n = 13$ ) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> ( $n = 15$ ;  $p = 0.17$ ; Figure 9C) IHCs. Together, our results indicate that endocytosis is unaffected in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs.

### The EPSC rate in IHC postsynaptic boutons is reduced in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice

The mean amplitude of excitatory postsynaptic currents (EPSCs) recorded at IHC postsynaptic boutons is known to be independent of presynaptic membrane voltage and  $Ca^{2+}$  influx during sustained stimulation (Goutman and Glowatzki, 2007). We therefore expected the mean EPSC amplitude to be unaffected in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice. We recorded EPSCs from single boutons on P8–P11, in the whole-cell patch-clamp configuration, as previously described (Glowatzki and Fuchs, 2002), eliciting IHC depolarization by increasing extracellular  $K^+$  concentration from 5.8 mM to 25 mM



**Figure 9.** Normal endocytosis, assessed by prolonged  $C_m$  measurements, in  $Otof^{C2C/C2C}$  IHCs. (A) *Left:* Examples of  $C_m$  traces, recorded over a period of 15 s, in response to a 100 ms depolarization to  $-10$  mV from a holding potential of  $-95$  mV, in P14-P17  $Otof^{C2C/+}$  and  $Otof^{C2C/C2C}$  IHCs. Horizontal dashed lines indicate the baseline  $C_m$ . The decay phase of  $C_m$  traces was fitted with a linear function (gray and light blue dotted lines). *Right:* Mean endocytosis rate in response to depolarizations lasting 20–100 ms in P14-P17  $Otof^{C2C/+}$  and  $Otof^{C2C/C2C}$  IHCs. (B) *Left:* Examples of  $C_m$  traces, recorded over a period of 20 s, in response to a 500 ms long depolarization to  $-10$  mV from a holding potential of  $-95$  mV, in  $Otof^{C2C/+}$  and  $Otof^{C2C/C2C}$  P14-P17 IHCs. The decay phase of  $C_m$  traces was fitted with a monoexponential function added to a linear function (gray and light blue lines). Dotted lines correspond to the linear component of these fits. *Right:* Mean time constant and amplitude of the exponential component of  $C_m$  decay in  $Otof^{C2C/+}$  and  $Otof^{C2C/C2C}$  IHCs. (C) *Left:* Example traces of the decay following exocytosis evoked by intracellular  $Ca^{2+}$  uncaging (purple arrowhead) in  $Otof^{C2C/+}$  and  $Otof^{C2C/C2C}$  IHCs. The decay period was fitted with a monoexponential function (gray and light blue dashed lines). *Right:* Mean time constant of the exponential component of  $C_m$  decay following exocytosis evoked by intracellular  $Ca^{2+}$  uncaging. The data were collected from the IHCs used in **Figure 6**. Data information: in (A–C), data are presented as the mean  $\pm$  SEM. ns not significant (Student's *t*-test with Welch correction). In (A–B),  $C_m$  traces were 100 Hz low-pass filtered.

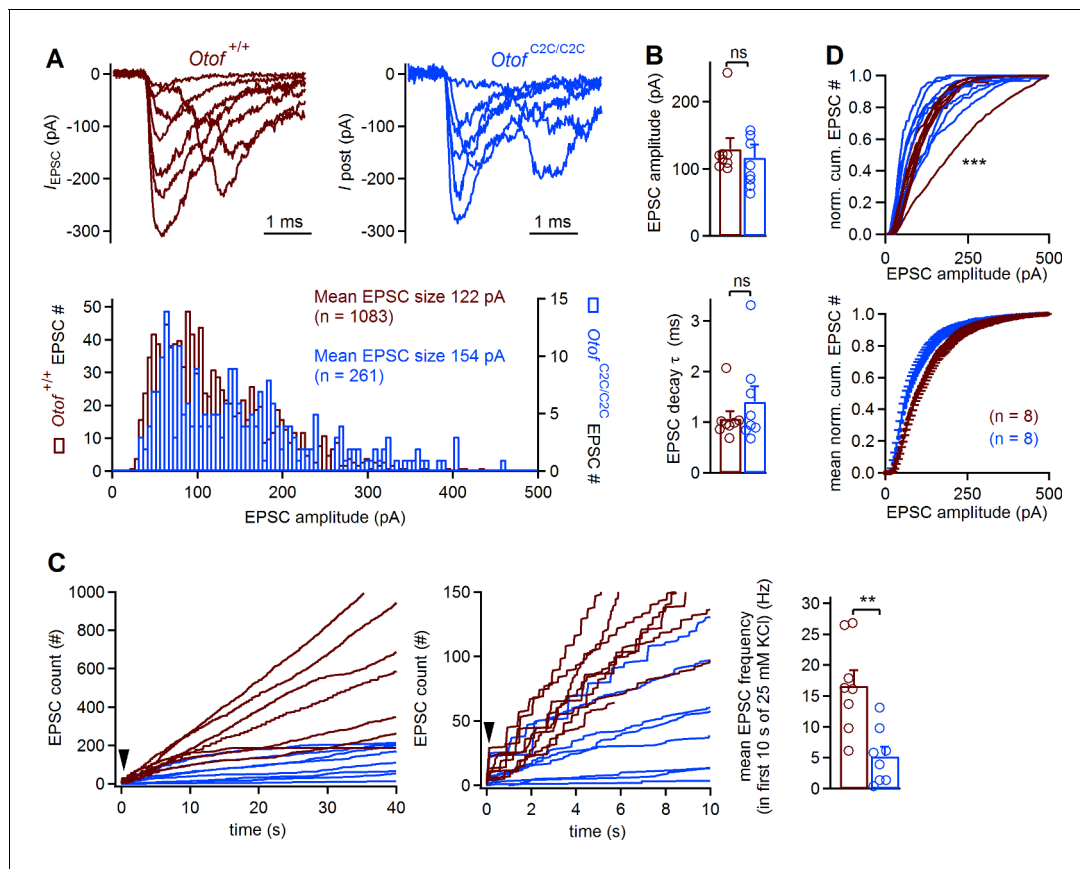
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.017>

The following figure supplement is available for figure 9:

**Figure supplement 1.** Example of a protocol used to probe endocytosis in an  $Otof^{C2C/+}$  IHC and corresponding recorded traces.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.018>

(**Figure 10A**). EPSC frequency increased in both  $Otof^{C2C/C2C}$  and  $Otof^{+/+}$  IHCs. Mean EPSC amplitude and EPSC decay time constant did not differ significantly between  $Otof^{C2C/C2C}$  ( $n = 8$ ) and  $Otof^{+/+}$  IHCs ( $n = 8$ ;  $p > 0.3$ ; **Figure 10B**). The mean EPSC rate in the first 10 s following 25 mM KCl application was, however, slower in  $Otof^{C2C/C2C}$  than in  $Otof^{+/+}$  IHCs (by a factor of 3.3; **Figure 10C**,  $p = 0.003$ ), consistent with the smaller amplitude of the ABR wave-I and the presynaptic exocytosis deficit in  $Otof^{C2C/C2C}$  IHCs. Single-vesicle and multivesicular release events were observed in both  $Otof^{C2C/C2C}$  and  $Otof^{+/+}$  IHCs (**Figure 10A**). However, the distribution of EPSC amplitudes was more variable in  $Otof^{C2C/C2C}$  IHCs than in  $Otof^{+/+}$  IHCs (Kolmogorov-Smirnov test,



**Figure 10.** Lower EPSC rates in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. (A) Superimposed example EPSC traces ( $I_{EPSC}$ ) recorded at *Otof*<sup>+/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHC afferent boutons on P8-P11, after extracellular application of 25 mM KCl (top), and histograms of EPSC amplitude distribution for the corresponding cells (bottom). (B) Bar graphs displaying the mean and individual EPSC amplitude and EPSC decay time constant ( $\tau$ ) in *Otof*<sup>+/+</sup> (n = 8) and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> (n = 8) IHCs. (C) *Left*: EPSC count as a function of time after the extracellular application of 25 mM KCl (indicated by an arrowhead) for all recorded *Otof*<sup>+/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. *Middle*: Zoom on the first 10 s of recording. *Right*: Bar graph displaying mean EPSC rate in the first 10 s of the K<sup>+</sup> challenge, in *Otof*<sup>+/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. (D) Mean and individual normalized cumulative EPSC number plotted against EPSC amplitude for *Otof*<sup>+/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. Data information: in (B–D), data are presented as the mean  $\pm$  SEM. In (B–C), \*\*p < 0.01, ns not significant (Student's t-test with Welch correction). In (D), \*\*\*p < 0.001 (Kolmogorov-Smirnov test).

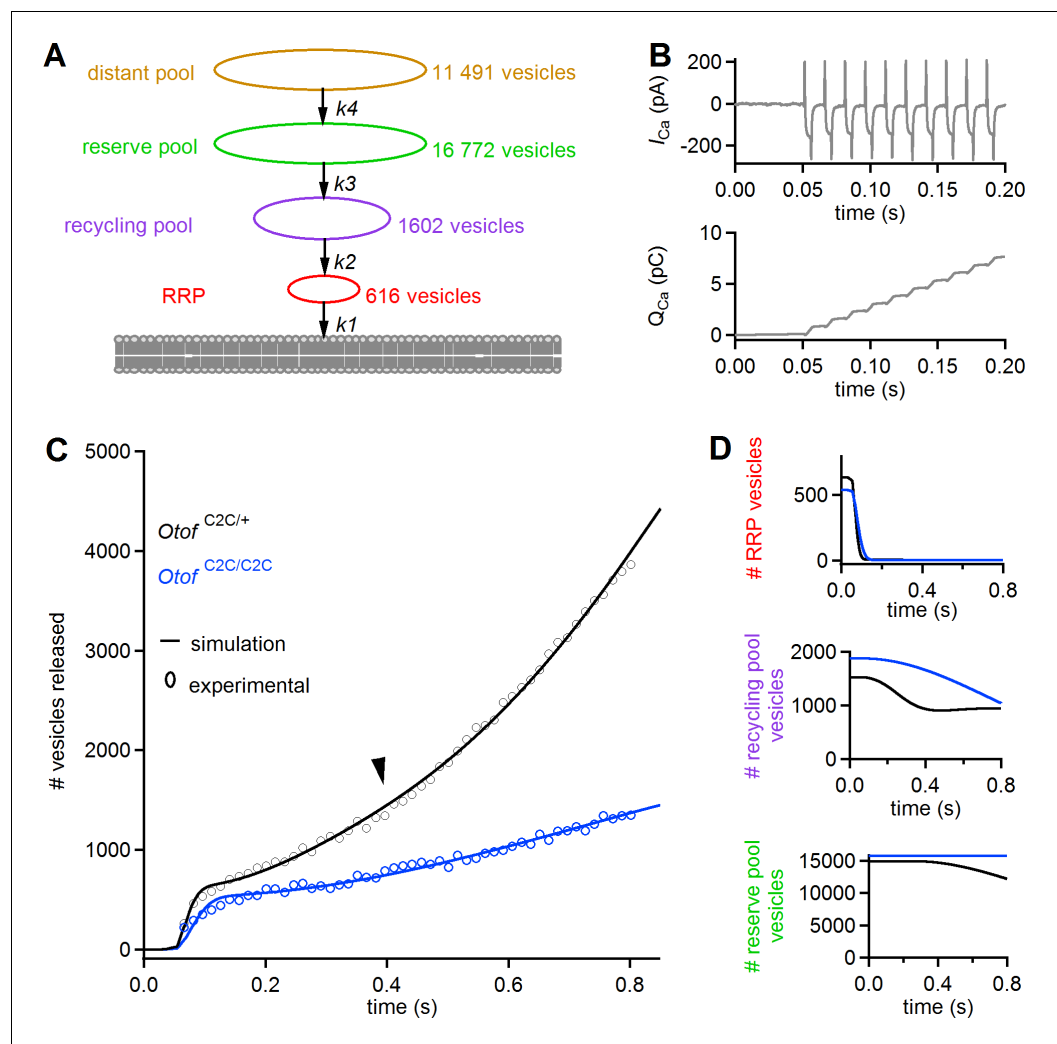
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.019>

$p < 10^{-3}$ ; **Figure 10D**), probably due to the defective vesicle fusion and vesicle pool replenishment in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. Our results do not support the existence of a specific effect of the C<sub>2</sub>C domain mutations on one release mechanism — unquantal (**Chapochnikov et al., 2014**) or multiquantal (**Li et al., 2014**) — rather than the other. Overall, our postsynaptic EPSC recordings confirmed that the synaptic vesicles of *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs can fuse with the plasma membrane, but at a slower rate than those of *Otof*<sup>+/+</sup> IHCs.

### Modeling of IHC synaptic release supports a dual role for otoferlin in Ca<sup>2+</sup> sensing for vesicle fusion and vesicle pool replenishment

We used a previously described simplified model of IHC synaptic vesicle exocytosis (**Schnee et al., 2005, 2011b**) to obtain a quantitative estimate of the in vivo Ca<sup>2+</sup>-sensing characteristics of otoferlin in RRP fusion and linear and superlinear release (**Figure 11A**). This model considers four vesicle pools (1 to 4) with different dynamics: pools 1, 2, and 3 correspond to the functionally defined RRP, recycling pool, and reserve pools, respectively. A 'distant pool' (DP, pool 4), equivalent to the entire IHC synaptic vesicle reservoir, is also included in the model. In normal conditions, this pool has little influence on the dynamics of the other pools. The main assumptions of the model are as follows: each of the four pools has a fixed size limit; vesicles exiting one pool immediately enter the next





**Figure 11.** A mass action model of synaptic release reproduces  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity defects in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. (A) Diagram of the synaptic vesicle pools described by the model: the RRP (red), the recycling pool (violet), the reserve pool (green), and the distant pool (yellow). The process of synaptic exocytosis is governed by four rate constants, for RRP vesicle fusion ( $k_1$ ), replenishment of the RRP from the recycling pool ( $k_2$ ), replenishment of the recycling pool from the reserve pool ( $k_3$ ), and replenishment of the reserve pool from the distant pool ( $k_4$ ). The vesicle numbers indicated for each pool are the results obtained by least-squares fitting to the experimental data for *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs. (B) Original  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{\text{Ca}}$ ) trace (recorded without the sine wave variation of the holding potential used to determine  $C_m$ ) elicited by a train of 50 successive 5 ms depolarizations in an *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHC (upper panel), and the corresponding integrated charge  $Q_{\text{Ca}}$  as a function of time (lower panel). (C) Experimental mean  $\Delta C_m$  data as in **Figure 8F**, converted into the number of fused vesicles (black and blue circles) during a train of 50 successive 5 ms depolarizations, superimposed onto the best least-squares fits (black and blue lines) of the model for *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs (see **Table 1**). (D) Corresponding simulation of changes in vesicle numbers for each vesicle pool in *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.020>

pool closer to the fusion site; and all vesicles entering the RRP eventually fuse. The kinetics of the various pools are governed by four mass-action equations describing the transitions of vesicles from pool 4 to pool 1 and their ensuing fusion (with transition rates  $K_4$ ,  $K_3$ ,  $K_2$ , and  $K_1$ , respectively (see **Equations (7)-(10)** in Materials and methods), and  $\text{Ca}^{2+}$  thresholds for the recruitment of each vesicle pool (see **Equations (1)-(4)**, in Materials and methods)). We took the observed  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of replenishment into account by modifying the model of Schnee *et al.* (Schnee *et al.*, 2011b) such

**Table 1.** Values of the parameters used in the mass action model of synaptic release

Parameter	Otof <sup>C2C/+</sup>	Otof <sup>C2C/C2C</sup>
V <sub>M1</sub>	616 ± 105 vesicles	570 ± 81 vesicles
V <sub>M2</sub>	1 602 ± 248 vesicles	1 877 ± 487 vesicles
V <sub>M3</sub>	16772 ± 8792 vesicles	11 312 ± 3835 vesicles
V <sub>M4</sub>	11 491 ± 2015 vesicles	14 171 ± 3562 vesicles
k <sub>1</sub>	1062 ± 583 C <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>	349 ± 169 C <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>
k <sub>2</sub>	6.4 ± 3.9 C <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>	0.8 ± 0.4 C <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>
k <sub>3</sub>	4.5 ± 9.9 C <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>	0.95 ± 0.86 C <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>
k <sub>4</sub>	(6.6 ± 5.2) × 10 <sup>-3</sup> C <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>	(8.5 ± 3.6) × 10 <sup>-3</sup> C <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>1</sub>	(1.7 ± 0.8) × 10 <sup>-14</sup> C	(2.1 ± 0.1) × 10 <sup>-14</sup> C
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>2</sub>	(8.3 ± 5.9) × 10 <sup>-13</sup> C	(6.7 ± 2.7) × 10 <sup>-13</sup> C
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>3</sub>	(8.7 ± 2.6) × 10 <sup>-12</sup> C	(10.2 ± 1.4) × 10 <sup>-12</sup> C
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>4</sub>	(9.7 ± 3.4) × 10 <sup>-12</sup> C	(9.7 ± 1.6) × 10 <sup>-12</sup> C

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.021>

that all transition rates were explicitly dependent on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration (see **Equations (1)-(4)**, in Materials and methods).

The input Ca<sup>2+</sup> concentration used was the integral of the Ca<sup>2+</sup> currents (taking the effective volume in which Ca<sup>2+</sup> diffusion occurs as a unit volume) recorded in Otof<sup>C2C/+</sup> mice (**Equation (5)** in Materials and methods) during trains of 50 depolarizations of 5 ms each, separated by 10 ms (**Figure 11B**, top). The values of the various model parameters (**Table 1**) were determined by least-squares fitting of all model parameters to experimental data (see **Table 1** and **Figure 11C-D**). Under the conditions described in **Table 1**, this modified model faithfully reproduced the three dynamic components observed in Otof<sup>C2C/+</sup> IHCs (RRP depletion, linear and superlinear release; **Figure 11C-D**). No Ca<sup>2+</sup> load terms other than those in the equations were required to reproduce the superlinear release component. Least-squares fits of the model to the experimental results for Otof<sup>C2C/C2C</sup> IHCs yielded values for the RRP fusion rate (K<sub>1</sub>) and the rate of transition from the recycling pool to the RRP (K<sub>2</sub>) lower than those in Otof<sup>C2C/+</sup> IHCs, by factors of 3.0 and 7.7, respectively (**Table 1**). The rate of transition from the reserve pool to the recycling pool (K<sub>3</sub>) was also markedly lower, but with a large confidence interval (**Table 1**). The Ca<sup>2+</sup> thresholds for the recruitment of each vesicle pool were similar in Otof<sup>C2C/+</sup> and Otof<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. The sizes of the four vesicle pools were also similar in Otof<sup>C2C/+</sup> IHCs and Otof<sup>C2C/C2C</sup> IHCs, consistent with the electron tomography results (**Figure 4**). Changes in the K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, and K<sub>3</sub> transition rates were, therefore, sufficient to reproduce the main features of the impairment of synaptic exocytosis observed in Otof<sup>C2C/C2C</sup> IHCs (slower RRP depletion, lower rate of linear release, and absence of superlinear release) (**Figure 11C-D**).

## Discussion

By genetically modifying the Ca<sup>2+</sup>-binding properties of the otoferlin C<sub>2</sub>C domain, we were able to investigate the hypothetical Ca<sup>2+</sup>-sensor function(s) of the protein in the mature IHC synapse in vivo. By contrast to previously reported Otof mouse mutants (**Roux et al., 2006; Longo-Guess et al., 2007; Pangrsic et al., 2010; Strenzke et al., 2016**), most morphological and functional features of the mature IHC synapse, and the amount and subcellular distribution of otoferlin were unchanged in the mutant Otof<sup>C2C/C2C</sup> mice. The structure of the IHC ribbon synapse, the sizes and densities of the different vesicle pools, and the distance of RRP synaptic vesicles from the presynaptic plasma membrane were similar in Otof<sup>C2C/+</sup> and Otof<sup>C2C/C2C</sup> mice. Only the distance between RAP vesicles and the ribbon was slightly larger in Otof<sup>C2C/C2C</sup> mice. The pool size of vesicles able to fuse was unaffected in Otof<sup>C2C/C2C</sup> IHCs, as shown by the normal maximal ΔC<sub>m</sub> evoked by Ca<sup>2+</sup> uncaging. The amplitude of voltage-triggered Ca<sup>2+</sup> currents and the spatiotemporal pattern of intracellular Ca<sup>2+</sup> diffusion were also unaffected. Finally, the tight coupling between Ca<sup>2+</sup> channels and RRP

vesicles was unmodified, with no observed change in RRP fusion kinetics in the presence of high intracellular EGTA concentrations. The necessary conditions for assessment of the specific effects of the C<sub>2</sub>C mutations on IHC synaptic exocytosis were therefore met.

Convergent lines of evidence indicate that mutations of the otoferlin C<sub>2</sub>C domain affected the Ca<sup>2+</sup> sensing domains involved in triggering the fusion of RRP vesicles at the IHC ribbon synapse. Through the various experimental protocols used to manipulate intracellular Ca<sup>2+</sup> levels near release sites during Ca<sup>2+</sup> channel activation, we found that these mutations almost halved the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the RRP sensor (i.e., decrease by a factor of 1.7 based on the modulation of depolarization levels, of 1.5 for variation of the duration of depolarization, or of 2.2 for the variation of extracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations). The lower Ca<sup>2+</sup> sensitivity of vesicle fusion in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> IHCs was further established by rapid increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration upon photolysis of caged Ca<sup>2+</sup> that resulted in a delayed onset of exocytosis and a doubling of the time taken to reach the maximal rate of fusion. By simultaneously monitoring  $\Delta C_m$  and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, we were able to show that the C<sub>2</sub>C domain mutation, by reducing the Ca<sup>2+</sup> affinity of otoferlin, affected the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of synaptic release but with no major effect on its cooperativity. Finally, the results of the simulation derived from the modified mass-action model (*Schnee et al., 2011b*) were consistent with a lower rate of RRP vesicle fusion at *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> IHC synapses. Together, our results show that otoferlin functions as a Ca<sup>2+</sup> sensor for vesicle fusion with the plasma membrane at the IHC ribbon synapse, and implicate the C<sub>2</sub>C domain in the Ca<sup>2+</sup> dependence of RRP vesicle fusion rate.

*Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> IHCs displayed sustained exocytosis in response to trains of depolarizing pulses (**Figure 8D–F**), but the rate for the linear component of this sustained release was about a third that in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/+</sup> IHCs, and the superlinear component of this release observed in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/+</sup> IHCs could be elicited in only one of 17 *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> IHCs. The finding of normal vesicle numbers, densities, and distributions in the RAP and OP, which are thought to underlie RRP replenishment, excluded the possibility of a smaller number of vesicles being the cause of the lower rate of sustained release in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> IHCs. This conclusion was also supported by the unaffected maximal release in Ca<sup>2+</sup> uncaging experiments in these mutants. The paired-pulse ratio (for different inter-pulse intervals) experiments, probing synaptic vesicle pool replenishment efficiency independently of fusion efficiency (*Moser and Beutner, 2000*), indicated that peak replenishment efficiency in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> IHCs was only half that in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/+</sup> IHCs, ruling out the possibility of the replenishment defect being merely a consequence of the impairment of RRP fusion. Consistent with this result, modification of the parameters governing the kinetics of RRP fusion alone in the model did not reproduce the slower rate of sustained release observed experimentally in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> IHCs. The simulations were consistent with the experimental results only if both the transition rate for vesicle fusion ( $K_1$ ) and that for synaptic vesicle pool replenishment ( $K_2$ ) were decreased. The detrimental effect of C<sub>2</sub>C mutations on synaptic vesicle pool replenishment is unlikely to be caused by an impairment of endocytosis, because endocytosis rates and synaptic vesicle numbers were similar in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/+</sup> and *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> IHCs. Finally, the RRP replenishment defect in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> IHCs was partially rescued, in terms of total synaptic release, by making Ca<sup>2+</sup> available at high concentrations throughout the cytoplasm, as in Ca<sup>2+</sup> uncaging experiments, suggesting that synaptic vesicle reformation is not affected in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> IHCs. The similar patterns of Ca<sup>2+</sup> entry and diffusion in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/+</sup> and *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> IHCs excluded a lower local Ca<sup>2+</sup> concentration as the cause of the superlinear release suppression in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> IHCs, and provided additional evidence that the lack of superlinear sustained release is due to the abnormal Ca<sup>2+</sup> sensing properties of the mutated otoferlin. We therefore conclude that the synaptic vesicle pool replenishment defect in *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> IHCs is independent of the RRP fusion defect, and results from the slower recruitment of vesicles to the release site caused by the lower Ca<sup>2+</sup> affinity of the mutated otoferlin. The molecular motor myosin VI, which has been shown to interact with otoferlin (*Roux et al., 2006; Heidrych et al., 2009*), might be involved in this recycling process.

What role does the otoferlin C<sub>2</sub>C domain play in IHC synaptic vesicle fusion and in synaptic vesicle pool replenishment? Otoferlin interacts with neuronal t-SNARE proteins through the C<sub>2</sub>A, C<sub>2</sub>B, C<sub>2</sub>C, C<sub>2</sub>E and C<sub>2</sub>F domains, and with the Ca<sub>v</sub>1.3 channel through the C<sub>2</sub>A, C<sub>2</sub>B, C<sub>2</sub>D, and C<sub>2</sub>F domains, but not the C<sub>2</sub>C domain, in vitro (*Roux et al., 2006; Ramakrishnan et al., 2009; Johnson and Chapman, 2010; Hams et al., 2017*). However, the presence of neuronal SNARE proteins in IHCs is under debate (*Nouvian et al., 2011*). The *Otof*<sup>C<sub>2</sub>C/C<sub>2</sub>C</sup> mutant IHCs still showed significant vesicle fusion and vesicle pool replenishment. Moreover, by contrast to the findings for *Otof*

<sup>-/-</sup> (Roux et al., 2006), pachanga mutant (Pangrsic et al., 2010), and *Otof*<sup>I515T/I515T</sup> mutant mice (Strenzke et al., 2016), all vesicles in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs were able to fuse when exposed to high Ca<sup>2+</sup> loads, such as those released in Ca<sup>2+</sup> uncaging experiments, although the fusion process was both slower and delayed. These results suggest that the lower Ca<sup>2+</sup>-binding affinity of otoferlin due to the C<sub>2</sub>C mutations can be partially overcome by high Ca<sup>2+</sup> concentrations. Consistent with this hypothesis, exocytosis levels in *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs were similar in particular recording conditions. For 20 ms-long IHC depolarizations of small amplitudes (to between -65 mV and -30 mV), resulting in few open Ca<sup>2+</sup> channels but strong Ca<sup>2+</sup> influx-driving forces, the Ca<sup>2+</sup> dependence of  $\Delta C_m$  was similar in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> and *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs. At these membrane potentials, the Ca<sup>2+</sup> sensor of the RRP vesicles closest to the few open Ca<sup>2+</sup> channels is readily saturated with Ca<sup>2+</sup>, triggering vesicle fusion at similar levels in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> and *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs. Based on the proposed role of the C<sub>2</sub>A domain in Syt1 (Shin et al., 2009), we suggest that Ca<sup>2+</sup> binding to the C<sub>2</sub>C domain of otoferlin enhances the activity of other C<sub>2</sub> domains, resulting in an increase in the overall Ca<sup>2+</sup>-sensitivity of release. Mutations of the otoferlin encoding gene are among the most frequent causes of inherited profound deafness in humans. Gene therapy projects based on the transfer of an otoferlin 'minigene', a method similar to that being developed for dysferlin defects (Sinnreich et al., 2006; Lek et al., 2013; Fuson et al., 2014), require to extend the present functional characterization of the otoferlin C<sub>2</sub>C domain to the other C<sub>2</sub> domains of the protein.

What consequences do the C<sub>2</sub>C domain mutations have for hearing? In one-month-old *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice, hearing thresholds were only slightly higher than normal, but the amplitude of the ABR wave-I, reflecting the synchronous activity of the auditory nerve fibers in vivo, was a third that in *Otof*<sup>C2C/+</sup> mice. The lower amplitude of ABR wave-I in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice is probably due to significantly lower rates of synaptic release and/or a desynchronization of synaptic vesicle fusion. Accordingly, although the mean amplitudes and decay time constants of primary auditory neuron EPSCs were unchanged, the EPSC rate following the extracellular application of 25 mM KCl was smaller in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice than in *Otof*<sup>+/+</sup> mice. This effect may be minimal on hearing in vivo since the receptor potentials of IHCs are unlikely to reach values beyond -20 mV upon sound stimulation (Palmer and Russell, 1986), that is they are expected to stay in a range at which not all Ca<sup>2+</sup> channels are open but the Ca<sup>2+</sup> driving force is relatively large, potentially leading to the local saturation of Ca<sup>2+</sup> sensors. In contrast, the much slower sustained release related to vesicle pool replenishment failure may affect hearing much more by contributing to a desynchronization of the auditory nerve fiber responses. Remarkably, despite the smaller ABR wave-I, the timing and amplitude of wave-II, which reflects the synchronous activity of the central auditory synaptic relays in the cochlear nucleus, were preserved in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice. It has been suggested that the anatomical convergence of many auditory nerve fibers onto principal neurons of the ventral cochlear nucleus may compensate to a certain degree the asynchronism effect of impaired IHC exocytosis on the response of auditory neurons (Buran et al., 2010).

We show here that the same Ca<sup>2+</sup> sensor, otoferlin, is involved in synaptic vesicle fusion and in synaptic vesicle pool replenishment at the IHC ribbon synapse. In many synapses, different steps of the synaptic vesicle cycle involve different Ca<sup>2+</sup> sensors. For instance, at the calyx of Held synapse, Syt2 drives synchronous vesicular exocytosis (Sun et al., 2007), and vesicle pool replenishment requires the Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-Munc13-1 complex (Lipstein et al., 2013). Likewise, rapid vesicular exocytosis at hippocampal synapses depends on Syt1, whereas vesicle pool replenishment involves Syt7 and calmodulin (Liu et al., 2014; Jackman et al., 2016). In some synapses, however, Syt1 or Syt2 are involved in several steps of the synaptic vesicle cycle. At the neuromuscular junction in *Drosophila*, Syt1 is involved both in exocytosis and endocytosis (Poskanzer et al., 2003), and in mouse cerebellum basket cells, the major Ca<sup>2+</sup> sensor for exocytosis, Syt2, also mediates fast vesicle pool replenishment (Chen et al., 2017). In IHCs we cannot exclude the possibility of otoferlin being assisted by other Ca<sup>2+</sup>-sensing proteins, such as Syt4, which has been shown to be involved in the developmental transition of exocytosis from nonlinear to linear Ca<sup>2+</sup> dependence (Johnson et al., 2010). Mature IHC ribbon synapses lack several proteins critical for vesicle fusion in synapses of the central nervous system, including Syt1 and Syt2 (Safieddine and Wenthold, 1999; Beurg et al., 2010), complexins, which act as important regulators of spontaneous and fast synchronous Ca<sup>2+</sup>-evoked fusion (Giraud et al., 2006; Strenzke et al., 2009; Krishnakumar et al., 2011; Lai et al., 2014), synaptophysin (Safieddine and Wenthold, 1999), and Munc13 (Vogl et al., 2015). In addition, neuronal SNARE proteins (synaptobrevins, snap-25, and syntaxin-1) have been reported to be

dispensable for exocytosis at the IHC ribbon synapse (Nouvian *et al.*, 2011), suggesting that other molecular components take on the role of these proteins. Such a singular molecular setting of the mature IHC ribbon synapse presumably optimizes the coordination between fast vesicle fusion and synaptic vesicle pool replenishment, allowing this synapse to operate indefatigably at high rates and with a high degree of temporal precision.

## Materials and methods

### Animals

Animal experiments were carried out in accordance with European Community Council Directive 2010/63/UE under authorizations 2012–028, 2012–038, and 2014–005 from the Institut Pasteur ethics committee for animal experimentation. The *Otof*<sup>Ala515,Ala517/Ala515,Ala517</sup> (referred to as *Otof*<sup>C2C/C2C</sup>) knock-in mouse mutant was generated by homologous recombination (Institut Clinique de la Souris, Illkirch, France). The targeting construct, spanning exon 15 (ENSEMBL ENSMUSE00001209343) and containing the two missense mutations, was introduced by electroporation into embryonic stem cells from the 129S1/SvImJ mouse strain. Stem cells carrying the desired construct were injected into blastocysts from C57BL/6J mice to obtain chimeric mice. After germline transmission, mice were crossed with C57BL/6J mice. Birth rates for all genotypes conformed to Mendelian ratios. Experiments were carried out on both male and female mice, mostly obtained by crossing heterozygous mice (*Otof*<sup>C2C/+</sup>) with homozygous mutant mice (*Otof*<sup>C2C/C2C</sup>), genotyped by PCR with the following primers: forward 5'-ATTACCTCTGCTGCTTTTGCACCTG-3' and reverse 5'-CTCAGCAGGTGCTTCTGACCAC-3', spanning the excised selection marker region in intron 15. As IHC synaptic exocytosis was similar in *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>+/+</sup> (i.e. wild-type) mice, this breeding scheme was used to produce substantial numbers of *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> homozygous mutant mice and *Otof*<sup>C2C/+</sup> mice (used as controls) within a given mouse litter. For all experiences, except otoferlin immunofluorescence quantification, experimentalists were not blinded against the genotypes of the mice.

### Immunohistofluorescence

The entire mouse inner ear was isolated from the surrounding bone, as previously described (Roux *et al.*, 2006). For rapid fixation of the cochlear sensory epithelium (organ of Corti), the round and oval windows were opened, the bone over the cochlear apical turn was removed, and the cochlea was perfused with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS). The cochlea was then post-fixed by incubation in the same fixative for 30 min at 4°C. Whenever the anti-Ca<sub>v</sub>1.3 antibody was used, the cochlea was fixed by incubation with 99% methanol for 20 min at –20°C. Cochlear whole-mount preparations were permeabilized by incubation with 0.3% Triton X-100 in PBS supplemented with 20% normal horse serum for one hour at room temperature. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used to stain cell nuclei. The following antibodies were used: rabbit anti-otoferlin (1:250 dilution) (Roux *et al.*, 2006), goat anti-CtBP2/ribeye (1:150 dilution; Santa Cruz Biotechnology; # sc-5966), rabbit anti-Ca<sub>v</sub>1.3 (1:50 dilution; Alomone Labs; #ACC-005), mouse anti-GluA2 (1:200 dilution; Millipore; #MAB397), rabbit anti-Vglut3 (1:250, Synaptic Systems, # 135 203) and secondary Atto Fluor Cy5-conjugated anti-mouse, Alexa Fluor 488-conjugated anti-goat, and Atto Fluor 647-conjugated anti-rabbit IgG (1:200 dilution, Sigma) antibodies. Anti-Ctbp2, anti-GluA2 and anti-Ca<sub>v</sub>1.3 antibodies have been widely used and shown to be specific (Beurg *et al.*, 2010; Liberman *et al.*, 2011; Jing *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2014; Vincent *et al.*, 2017). After incubation with the appropriate antibodies, the samples were washed three times in PBS, and mounted in one drop of Fluorsave medium (Biochem Laboratories, France). Fluorescence confocal z-stacks from selected cochlear regions were obtained with an LSM 700 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a high-resolution objective (numerical aperture of 1.4, 60 x oil-immersion objective). Images were acquired with a 4 x digital zoom in a 1024 × 1024 raster (pixel size = 0.036 μm in x and y) with 0.2 μm steps in z. Three *Otof*<sup>C2C/+</sup> and five *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice were examined for the analysis of otoferlin labeling. Four *Otof*<sup>C2C/+</sup> and four *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice were examined for determination of the number of ribbon synapses per IHC.

For otoferlin immunofluorescence quantification, whole-mount preparations of organs of Corti from *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> littermates were blind-processed in parallel, using the same

experimental settings from tissue fixation to confocal imaging. For each organ of Corti, fluorescence intensity was averaged in Gaussian volumes with standard deviations of 1  $\mu\text{m}$  along the X, Y and Z axes, centered around points selected at the apex, the middle, and the base of 7–8 IHCs per confocal stack (for a total of 51 *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs and 52 *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs). In effect, the 3D images were blurred by convolution with a Gaussian of the prescribed standard deviations, and intensity values of the blurred images at the selected points were retrieved.

### STED microscopy

Dual-color STED microscopy was carried out with a custom-built system (Lauterbach et al., 2013) using two excitation beams at  $480 \pm 10$  nm and  $532 \pm 5$  nm obtained by filtering a super-continuum laser beam, and one STED beam tuned at 647 nm, coupled with a helical phase mask (VPP-A1, RPC Photonics, New York) to produce a toroidal (donut-shaped) diffraction pattern centered on the excitation spot in the focal plane of a 100 x/1.4NA objective lens (Olympus, Tokyo, Japan). Since the two excitation beams arise from a single monomode optical fiber, the two color-channels are co-aligned by design. Two-color STED imaging was achieved with two dyes, Atto565 and DY485XL, excited with the 532 nm and 480 nm excitation beams, respectively. Atto565 has excitation and emission peaks around 563 nm and 592 nm, respectively, whereas the long Stokes-shift dye DY485XL displays maximal excitation at about 485 nm, with an emission peak at around 560 nm. Fluorescence images were sequentially collected with an avalanche photodiode (Perkin Elmer) behind a 585/65 emission filter. A pixel size of 50 nm and a scanning dwell time of 100  $\mu\text{s}$  were used for the acquisitions.

### STED microscopy image processing and colocalization analysis

Wavelet denoising and deconvolution were applied to the images, as previously described, with a point spread function extracted from the images (de Monvel et al., 2003), and linear unmixing was used to compensate for slight leakage between the two excitation channels. The staining patterns observed in the Atto565- and the DY485-channel images was granular, and consisted in many resolution-limited spots representing structures stained for otoferlin and Vglut3, referred to as otoferlin spots and Vglut3 spots, respectively, within the cells. The densities of either the Vglut3 or the otoferlin spots were similar within all the cells analyzed ( $p > 0.05$ , Kolmogorov-Smirnov test). This made it possible to analyze the colocalization of otoferlin and Vglut3 spots by determination of the positions of each type of spots within the cells of interest, which could be achieved with a resolution better than the pixel size by maxima detection. Nearest-neighbor analysis was then performed by comparing the distribution of the distance between a randomly chosen otoferlin spot and the nearest Vglut3 spot, to quantify the colocalization of the two proteins, with the distribution of the distance between a random Vglut3 spot and the nearest neighboring Vglut3 spot, corresponding to the expected distribution of nearest-neighbor distances for randomly distributed points. The shift of the otoferlin-Vglut3 nearest-neighbor distance distribution towards distance values smaller than expected for a purely random distribution indicated colocalization of the two proteins.

### Electron tomography

Cochleas were perfused with 4% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in Sorensen buffer at pH 7.4, and immersed in the fixative solution for 2 hr. They were then postfixed by incubation overnight in 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer at 4°C. They were dehydrated in a graded series of acetone concentrations and embedded in Spurr's low-viscosity epoxy resin (EMS, Hatfield, USA), which was then hardened at 70°C. For tomographic analysis, thick (200 or 250 nm) sections of the sensory epithelium (organ of Corti) were collected on 100-mesh parallel bar copper grids, and incubated, for 10 min on each side, with 15 nm protein gold particles (UMC Utrecht, The Netherlands). The grids were contrast-stained with 4% uranyl acetate in dH<sub>2</sub>O for 40 min, followed by Reynold's lead citrate for 3 min. The sections were viewed in an FEI Tecnai G2 200kV transmission electron microscope, and single- or double-tilt series were acquired from approximately  $-65^\circ$  to  $+65^\circ$  with  $1^\circ$  increments, with FEI Xplore 3D software and a Gatan US 4000 camera. The acquired tilt series were processed with a wavelet-denoising algorithm implemented in Matlab (Mathworks) (Boutet de Monvel et al., 2001) to reduce background noise without losing fine detail. The images of the

tomographic tilt series were then aligned, and the final volume was reconstructed with a weighted back-projection algorithm and IMOD software (Kremer *et al.*, 1996).

### 3D reconstructions and estimates of vesicle pool sizes

Analyses of the ribbon synapses, including segmentation, 3D reconstruction, and rendering, were carried out with AMIRA software (version 5.1; Mercury Computer Systems, San Diego, CA) and with custom Matlab functions (Mathworks). The contours of the ribbon, the presynaptic density of the afferent dendrite, and nearby organelles, such as mitochondria, coated pits, and tubular structures, were drawn on every section. Spheres of constant diameter were used to mark synaptic vesicles. The ribbon was defined as the center of the active zone. For each ribbon, we counted the number of synaptic vesicles within 80 nm of the ribbon surface. These vesicles were considered to constitute the ribbon-attached vesicle pool (RAP), which is thought to correspond to the functional recycling and reserve pools (Rizzoli and Betz, 2005). A subset of the ribbon-attached vesicles, with centers lying within 40 nm of the presynaptic membrane and below the ribbon (within 80 nm of the center of the active zone), was considered to form the pool of docked or readily releasable vesicles (the RRP), thought to be released first during depolarization (Lenzi *et al.*, 1999; Schnee *et al.*, 2011a). We chose this distance of 40 nm, because the mean radius of a vesicle was ~20 nm and because the cytosolic parts of t-SNARE and v-SNARE are ~10 nm long, so SNARE interactions may occur at distances of up to 20 nm from the presynaptic plasma membrane (Zenisek *et al.*, 2000; Castorph *et al.*, 2010). Using our ribbon reconstruction data and taking the distribution of synaptic vesicles into account, we estimated the total size and volume density of the synaptic vesicles attached to each ribbon, and the number and volume density of outlying cytoplasmic vesicles located within 350 nm of the ribbon surface — the outlying vesicle pool (OP) thought to contribute to the functional reserve pool (Rizzoli and Betz, 2005). We estimated these vesicle pools in our tomographic reconstructions of ribbon synapses, using only ribbon reconstructions including more than half of the ribbon surface. The numbers and densities of vesicles in each pool were obtained with a distance transformation (implemented in Matlab) providing volume shells around the ribbon delimited by various distances from the ribbon surface.

### Functional hearing tests

Auditory brainstem responses (ABRs) and distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) were recorded, as previously described (Le Calvez *et al.*, 1998), in mice aged between 1 and 13 months. ABR waves were recorded in response to pure tone bursts at sound frequencies of 10, 15, 20, and 32 kHz. ABR signals were averaged after the presentation of a series of 100–200 pure tone bursts. ABR thresholds were defined as the lowest stimulus for which recognizable ABR waves could be observed. The amplitude of ABR wave-I was estimated by measuring the voltage difference between the wave-I peak and the trough between wave-I and wave-II.

DPOAEs were collected with a miniature microphone positioned at the entry of the ear canal. Two primary pure-tone stimuli of frequencies  $f_1$  and  $f_2$  were applied simultaneously, with  $f_2$  between 5 and 20 kHz, and the  $f_2/f_1$  ratio kept constant at 1.2. The cubic difference tone at  $2f_1 - f_2$ , the most prominent distortion product tone produced by the mammalian ear, was measured for primary tone frequencies of equal levels, ranging from 30 to 75 dB SPL.

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

Electrophysiological recordings were carried out on excised cochlear apical coils of either prehearing (P8-P12) or hearing (P15-P18) *Otof*<sup>+/+</sup>, *Otof*<sup>C2C/+</sup>, and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice, as previously described (Beurg *et al.*, 2010). The dissection solution contained 143 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.9 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.7 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM glucose, 2 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, pH 7.4. Recordings were carried out at room temperature (20–23°C). The patch pipette electrodes were made of borosilicate glass (World Precision Instruments).

For cell capacitance experiments on IHCs, the pipette resistance in the external solution was 2–3 M $\Omega$ . Only cells with a series resistance below 10 M $\Omega$  (uncompensated) were included in the study.  $\text{Ca}^{2+}$  current and  $\Delta C_m$  were recorded with an EPC-9 patch-clamp amplifier and Patchmaster software (HEKA). We used a single 30 mV amplitude sine wave from a holding potential of –95 mV. Except for endocytosis recordings, the acquisition frequency was 50 kHz, low-pass filtered at 6–10 kHz, and

the frequency of the sine wave was 1 kHz. In the case of endocytosis recordings, the acquisition frequency was set to 10 kHz, and the frequency of the sine wave to 800 Hz. The resulting maximal depolarization to  $\sim -65$  mV was sufficiently small to avoid activation of the  $\text{Ca}^{2+}$  current.  $\text{Ca}^{2+}$  current recordings were corrected for the linear leak conductance measured near  $-95$  mV. Liquid junction potential ( $\sim -15.5$  mV) was corrected off-line for Cs-gluconate-based intracellular solutions. The extracellular recording solution consisted of 111.5 mM NaCl, 6 mM KCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 27 mM TEA-Cl, 2 mM sodium pyruvate, 5 mM glucose, 10 mM Na-HEPES, pH 7.4 (adjusted with NaOH). Tetrodotoxin (1  $\mu\text{M}$ ) and apamin (1  $\mu\text{M}$ ) were added to the extracellular solution. The intracellular pipette solution for cell membrane capacitance recordings contained 140 mM Cs-gluconate, 20 mM TEA-Cl, 0.5 mM EGTA, 5 mM creatine phosphate, 4 mM Mg-ATP, 0.3 mM  $\text{Na}_2\text{-GTP}$ , 10 mM HEPES, pH 7.2 (adjusted with CsOH). We used 10 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and 0.5 mM intracellular EGTA unless otherwise specified. The  $\Delta C_m$  evoked by membrane depolarization was measured as  $\Delta C_m = C_m(\text{response}) - C_m(\text{baseline})$ , and was used as a measure of synaptic vesicle exocytosis in IHCs.  $C_m(\text{baseline})$  was obtained by averaging capacitance data points before the depolarizing pulse, and  $C_m(\text{response})$  was obtained by averaging capacitance data points after the transient current following the depolarizing pulse (**Figure 5—figure supplement 1A**). With depolarizing protocols, possible kinetic perturbations in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs are likely to be masked by the relatively long time interval between the end of the depolarizing stimulus and the measurement of the post-stimulus  $C_m$  (typically 50–100 ms for a depolarization lasting 20 ms).

$\text{Ca}^{2+}$  imaging experiments were carried out by adding 200  $\mu\text{M}$  Oregon Green Bapta 5N dye (OGB-5N, Invitrogen) to the intracellular patch pipette solution. Images were acquired at a rate of 500 Hz, with a high-speed camera (Photometrics) mounted on a swept-field confocal microscope (Bruker). Imaging protocols began two minutes after cell opening, to allow the OGB-5N dye to diffuse.  $\text{Ca}^{2+}$  entry was assessed by selecting regions of interest (a circle with a 6-pixel radius), in which the standard deviation of the fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  signal was maximal during IHC depolarization (see the images in **Figure 8—figure supplement 1A**).

## $\text{Ca}^{2+}$ uncaging experiments

We triggered a rapid rise in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration from the  $\text{Ca}^{2+}$  caged by the DM-nitrophen chelator (Interchim, France), using a single flash from a high-power UV LED light source (Mic-LED 365, 128 mW, Prizmatix, Givat Shmuel, Israel). The UV LED TTL triggered through the EPC10 patch clamp amplifier, was directly connected to the epi-illumination port at the rear of an upright Nikon FN1 microscope, and illumination was focused through the 60 x objective (CFI Fluor 60 x W NIR, WD = 2.0 mm, NA = 1). Hair cells were loaded with 145 mM CsCl, 5 mM HEPES, 20 mM TEA, 10 mM DM-nitrophen and 10 mM  $\text{CaCl}_2$ . After patch rupture, we systematically kept the cells at a holding potential of  $-70$  mV (without leak correction) for 2 min, for cell loading and equilibration.

In some experiments, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was measured by adding 50  $\mu\text{M}$  OGB-5N to the intracellular solution, as previously described (**Vincent et al., 2014; Vincent et al., 2015**). Changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  were measured with a C2 confocal system and NIS-elements imaging software (Nikon, Japan) coupled to the FN1 Nikon upright microscope. The dye was excited with a 488 nm solid-state laser (85-BCD-010-706, Melles Griot, CA USA) and emission was recorded at 500–530 nm. OGB-5N-emission fluorescence was continuously monitored before and after the UV flash, by fast line scan analysis at 1 kHz spanning the middle part of the IHC. The  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent fluorescent signal of OGB-5N was calibrated in situ, in the hair cell cytoplasm, as previously described (**Vincent et al., 2014**). Hair cells were voltage-clamped at  $-70$  mV in the whole-cell configuration with different solutions containing various free calcium concentrations ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ ), from 1 to 100  $\mu\text{M}$ . The patch pipettes were filled with a Cs-based solution (145 mM CsCl, 5 mM HEPES, 20 mM TEA, 0.05 mM OGB-5N 0.05) and various concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  and EGTA. The Ca-EGTA Maxchelator freeware (Stanford, CA, USA) was used to determine  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ . After 2 min of cell loading and equilibrium, the fluorescence signal was measured at each  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$  in different cells. Fluorescence emission values were plotted as  $F/F_{\text{max}}$  against  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ . Data points were best fitted by a sigmoidal function with a  $K_D$  of  $23.30 \pm 0.71$   $\mu\text{M}$ . This  $K_D$  value is very close to the value reported in vitro ( $K_D = 20$   $\mu\text{M}$ , Molecular Probes, Life Technologies). We quantified  $\text{Ca}^{2+}$  responses in each hair cell during the  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging experiments, by calculating the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) as follows (**Pawley, 2006**, chapter 42):  $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)$ , where  $K_D$  is the estimated



constant of dissociation,  $F$  the fluorescence at time  $t$ ,  $F_{\min}$  the minimum fluorescence, and  $F_{\max}$  the maximal fluorescence.

$C_m$  recordings in  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging experiments were performed with an EPC-10 patch-clamp amplifier. The amplitude and frequency of the sine wave were 20 mV and 1 kHz, respectively.

## EPSC recordings

Postsynaptic bouton recordings of EPSCs were performed as previously described (*Glowatzki and Fuchs, 2002*). Pipette resistance in the external solution was 8–10 M $\Omega$ . The external solution contained 5.8 mM KCl, 144 mM NaCl, 0.9 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4 (adjusted with NaOH), and the pipette solution for intracellular recording contained 135 mM KCl, 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 5 mM HEPES, 2.5 mM Na<sub>2</sub>ATP, pH 7.2 (adjusted with KOH). EPSCs were induced by increasing extracellular K<sup>+</sup> concentration from 5.8 mM to 25.8 mM, by replacing 20 mM NaCl with 20 mM KCl in the external solution. EPSC recordings were performed with a MultiClamp 700B amplifier (Molecular Devices), and a National Instruments digitizer (NI-PCIe 6351). They were low-pass filtered at 6 kHz, and digitized at 50 kHz.

Data were analyzed as previously described (*Glowatzki and Fuchs, 2002; Goutman and Glowatzki, 2007*). In the case of overlapping EPSCs, the amplitude of the second EPSC was estimated by fitting the decay of the first EPSC and subtracting the fitted value at the time of the second peak. Decay time constants were calculated with monophasic recorded EPSCs only.

## Statistical analysis

The data were analyzed with Igor Pro (WaveMetrics) and Prism (Graphpad) softwares. Values of  $p < 0.05$  were considered to indicate that the differences observed between groups were statistically significant. Two-tailed unpaired Student's  $t$  tests with Welch's correction, which does not assume equal variances, were used, unless otherwise stated. The other tests performed included two-way ANOVA with Bonferroni post hoc tests to assess the interaction between two independent variables, Kolmogorov-Smirnov tests to compare distributions, Fisher's exact tests to compare proportions, and nonparametric Mann-Whitney tests when the data could not be assumed to be normally distributed, precluding use of the parametric Student's  $t$  test. The normality of data distribution was assessed with the D'Agostino and Pearson normality test. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) unless otherwise stated. Numbers ( $n$ ) in the figures and text indicate the number of biological replicates derived from independent experiments. Asterisks on bar graphs denote the statistical significance of the differences indicated in brackets (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; and \*\*\* $p < 0.001$ ), whereas ns indicates 'not significant' ( $p > 0.05$ ).

## Modeling

Simulations of synaptic vesicle fusion in *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> and *Otof*<sup>C2C/+</sup> IHCs were carried out with a modified version of a published mass action model of synaptic vesicle fusion in IHCs (*Schnee et al., 2005; Schnee et al., 2011b*) (*Figure 11A*). This model considers four functional vesicle pools: the RRP, the recycling pool, the reserve pool (*Rizzoli and Betz, 2005*), and a distant pool equivalent to the entire reservoir of IHC vesicles (*Schnee et al., 2011b*). Vesicle trafficking between pools is governed by five first-order differential equations. The transition rate constants for RRP vesicle fusion ( $K_1$ ), and for vesicle trafficking from the recycling pool to the RRP ( $K_2$ ), from the reserve pool to the recycling pool ( $K_3$ ), and from the distant pool to the reserve pool ( $K_4$ ) (see *Figure 11A*), were set so as to depend on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) (here expressed in units of charge (C), which corresponds to taking the effective volume in which  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion occurs as a unit volume) as follows:

$$K_1(t) = k_1 \cdot \max([\text{Ca}^{2+}]_i(t) - [\text{Ca}^{2+}]_1; 0) \quad (1)$$

$$K_2(t) = k_2 \cdot \max([\text{Ca}^{2+}]_i(t) - [\text{Ca}^{2+}]_2; 0) \quad (2)$$

$$K_3(t) = k_3 \cdot \max([\text{Ca}^{2+}]_i(t) - [\text{Ca}^{2+}]_3; 0) \quad (3)$$

$$K_4(t) = k_4 \cdot \max([Ca^{2+}]_i(t) - [Ca^{2+}]_4; 0) \quad (4)$$

$$[Ca^{2+}]_i(t) = \int^t I_{Ca}(t) \cdot dt \quad (5)$$

where  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ , and  $k_4$  are  $Ca^{2+}$ -independent rate constants associated with the various pools,  $[Ca^{2+}]_1, \dots, [Ca^{2+}]_4$  represent the minimum  $Ca^{2+}$  concentrations triggering RRP fusion, and vesicle transitions from the recycling pool, the reserve pool, and the distant pool, respectively (**Figure 11A**). Minimum  $Ca^{2+}$  concentrations were set to mimic recruitment of the additional pools of vesicles with the delays observed experimentally. Vesicle trafficking between pools and fusion were also constrained by the use of a maximum vesicle number:  $V_{M1}$ ,  $V_{M2}$ ,  $V_{M3}$ , and  $V_{M4}$  for the RRP, recycling pool, reserve pool, and distant pool, respectively. These properties give rise to the following five equations governing the number of fused vesicles  $F(t)$  and vesicle number  $V(t)$  in each of the four vesicle pools:

$$dF(t)/dt = K_1(t) \cdot V_1(t) \quad (6)$$

$$dV_1(t)/dt = K_2(t) \cdot V_2(t) \cdot ((V_{M1} - V_1(t))/V_{M1}) - K_1(t) \cdot V_1(t) \quad (7)$$

$$dV_2(t)/dt = K_3(t) \cdot V_3(t) \cdot ((V_{M2} - V_2(t))/V_{M2}) - K_2(t) \cdot V_2(t) \cdot ((V_{M1} - V_1(t))/V_{M1}) \quad (8)$$

$$dV_3(t)/dt = K_4(t) \cdot V_4(t) \cdot ((V_{M3} - V_3(t))/V_{M3}) - K_3(t) \cdot V_3(t) \cdot ((V_{M2} - V_2(t))/V_{M2}) \quad (9)$$

$$dV_4(t)/dt = -K_4(t) \cdot V_4(t) \cdot ((V_{M3} - V_3(t))/V_{M3}) \quad (10)$$

Initial conditions were set as follows:

$$F(t=0) = 0, V_i(t=0) = V_{Mi}, i = 1, \dots, 4. \quad (11)$$

Equations were implemented in Igor Pro 6 software (Wavemetrics) and in Matlab. The parameters  $[Ca^{2+}]_1, [Ca^{2+}]_2, [Ca^{2+}]_3, [Ca^{2+}]_4, k_1, k_2, k_3, k_4, V_{M1}, V_{M2}, V_{M3}$ , and  $V_{M4}$  were obtained by least-squares fitting to the experimental data obtained for *Otof*<sup>C2C/+</sup> and *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> IHCs. In detail, the sum-of-squares error on the  $C_m$  curve was defined as the sum of squared differences between the averaged  $C_m$  values measured as a function of some experimental parameter (depolarisation amplitude, duration of stimulus, or number of depolarisation pulses) and the corresponding  $C_m$  values predicted by the model for a given set of fitting parameters. This error was minimized using the Matlab built-in minimization function (fminsearch function), which is a general-purpose nonlinear minimization function based on the simplex algorithm (**Lagarias et al., 1998**). Weighting of the squared errors was uniform. The following interval constraints were applied to the fitting parameters at all iterations:  $k_1, \dots, k_4$  between 0 and  $10^4$ ;  $V_{M1}, V_{M2}$  between 0 and  $10^5$ ;  $V_{M3}$  between 5000 and  $10^5$ , and  $V_{M4}$  between 10000 and  $10^5$ ;  $[Ca^{2+}]_1, \dots, [Ca^{2+}]_4$  between 0 and 10. Error estimates on the fitted parameters were obtained by a Monte-Carlo sensitivity analysis of the fit. Namely, we generated 60 randomized versions of the  $C_m$  curves, assuming for each data point a gaussian distribution with the same mean and standard deviation as observed experimentally; we applied the same fitting procedure on each randomized  $C_m$  curve. The mean values and standard deviations stated in **Table 1** were computed from 60 such Monte Carlo runs performed for each phenotype.

## Acknowledgements

We thank Dominique Weil and the *Institut Clinique de la Souris* (Illkirch, France) for providing us with the recombinant *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> mice, and Philippe Vincent for advice for the  $Ca^{2+}$  uncaging experiments. This work was supported by *Foundation Raymonde et Guy Strittmatter*, *Foundation BNP Paribas* and *LHW-Stiftung* grants to CP. This work was carried out in the framework of the LabEx Lifesenses [ANR-10-LABX-65] and was supported by French state funds managed by the *Agence*

Nationale pour la Recherche within the Investissements d'Avenir program under reference ANR-11-IDEX-0004-02, and the Prix Emergence of the Agir pour l'Audition foundation to NM.

## Additional information

### Competing interests

Christine Petit: Reviewing editor, *eLife*. The other authors declare that no competing interests exist.

### Funding

Funder	Grant reference number	Author
Foundation Raymonde et Guy Strittmatter	Research project grant	Christine Petit
Foundation BNP Parisbas	Research project grant	Christine Petit
LHW-Stiftung	Research project grant	Christine Petit
LabExLifesenses	ANR-10-LABX-65	Christine Petit
Investissements d'Avenir	ANR-11-IDEX-0004-02	Christine Petit
Agir pour l'Audition	Prix Emergence scientifique	Nicolas Antoine Michalski

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

### Author contributions

Nicolas Antoine Michalski, Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Validation, Investigation, Visualization, Methodology, Writing—original draft, Project administration, Writing—review and editing; Juan D Goutman, Jacques Boutet de Monvel, Roger Bryan Sutton, Paul Avan, Formal analysis, Validation, Investigation, Visualization, Methodology, Writing—review and editing; Sarah Marie Auclair, Danica Ciric, Formal analysis, Investigation; Margot Tertrais, Alice Emptoz, Alexandre Parrin, Sylvie Nouaille, Investigation; Marc Guillon, Formal analysis, Investigation, Methodology; Martin Sachse, Methodology; Amel Bahloul, Formal analysis, Supervision, Validation, Investigation; Jean-Pierre Hardelin, Writing—review and editing; Shyam S Krishnakumar, Formal analysis, Supervision, Validation, Investigation, Visualization, Methodology; James E Rothman, Supervision, Validation; Didier Dulon, Formal analysis, Supervision, Validation, Investigation, Visualization, Methodology, Writing—review and editing; Saaid Safieddine, Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Validation, Investigation, Visualization, Methodology, Project administration, Writing—review and editing; Christine Petit, Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Validation, Project administration, Writing—review and editing, Designed the study

### Author ORCIDs

Shyam S Krishnakumar, <http://orcid.org/0000-0001-6148-3251>

James E Rothman, <http://orcid.org/0000-0001-8653-8650>

Christine Petit, <https://orcid.org/0000-0002-9069-002X>

### Ethics

Animal experimentation: Animal experiments were carried out in accordance with European Community Council Directive 2010/63/UE under authorizations 2012-028, 2012-038, and 2014-005 from the Institut Pasteur ethics committee for animal experimentation.

### Decision letter and Author response

Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.023>

Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.024>

## Additional files

### Supplementary files

- Transparent reporting form

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31013.022>

## References

- 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. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1321498>, PMID: 1321498
- 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: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2528-10.2010>, PMID: 20926654
- 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. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00243-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00243-4), PMID: 11301027
- Boutet de Monvel J**, Le Calvez S, Ulfendahl M. 2001. Image restoration for confocal microscopy: improving the limits of deconvolution, with application to the visualization of the mammalian hearing organ. *Biophysical Journal* **80**:2455–2470. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76214-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76214-5), PMID: 11325744
- Brandt A**, Khimich D, Moser T. 2005. Few CaV1.3 channels regulate the exocytosis of a synaptic vesicle at the hair cell ribbon synapse. *Journal of Neuroscience* **25**:11577–11585. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3411-05.2005>, PMID: 16354915
- Brose N**, Petrenko AG, Südhof TC, Jahn R. 1992. Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* **256**:1021–1025. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1589771>, PMID: 1589771
- 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. *Journal of Neuroscience* **30**:7587–7597. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0389-10.2010>, PMID: 20519533
- Castellano-Muñoz M**, Schnee ME, Ricci AJ. 2016. Calcium-induced calcium release supports recruitment of synaptic vesicles in auditory hair cells. *Journal of Neurophysiology* **115**:226–239. DOI: <https://doi.org/10.1152/jn.00559.2015>, PMID: 26510758
- Castorph S**, Riedel D, Arleth L, Sztucki M, Jahn R, Holt M, Salditt T. 2010. Structure parameters of synaptic vesicles quantified by small-angle x-ray scattering. *Biophysical Journal* **98**:1200–1208. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.12.4278>, PMID: 20371319
- Chapochnikov NM**, Takago H, Huang CH, Pangršič T, Khimich D, Neef J, Auge E, Göttfert 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.003>, PMID: 25199706
- Chen C**, Arai I, Satterfield R, Young SM, Jonas P. 2017. Synaptotagmin 2 Is the Fast Ca<sup>2+</sup> Sensor at a central inhibitory synapse. *Cell Reports* **18**:723–736. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.067>, PMID: 28099850
- de Monvel JB**, Scarfone E, Le Calvez S, Ulfendahl M. 2003. Image-adaptive deconvolution for three-dimensional deep biological imaging. *Biophysical Journal* **85**:3991–4001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74813-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74813-9), PMID: 14645088
- 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. *Journal of Neuroscience* **29**:10474–10487. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1009-09.2009>, PMID: 19710301
- Duncker SV**, Franz C, Kuhn S, Schulte U, Campanelli D, Brandt N, Hirt B, Fakler B, Blin N, Ruth P, Engel J, Marcotti W, Zimmermann U, Knipper M. 2013. Otoferlin couples to clathrin-mediated endocytosis in mature cochlear inner hair cells. *Journal of Neuroscience* **33**:9508–9519. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5689-12.2013>, PMID: 23719817
- Fernández-Chacón R**, Königstorfer A, Gerber SH, García J, Matos MF, Stevens CF, Brose N, Rizo J, Rosenmund C, Südhof TC. 2001. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* **410**:41–49. DOI: <https://doi.org/10.1038/35065004>, PMID: 11242035
- Fuchs PA**. 2005. Time and intensity coding at the hair cell's ribbon synapse. *The Journal of Physiology* **566**:7–12. DOI: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.082214>, PMID: 15845587
- Fuson K**, Rice A, Mahling R, Snow A, Nayak K, Shanbhogue P, Meyer AG, Redpath GM, Hinderliter A, Cooper ST, Sutton RB. 2014. Alternate splicing of dysferlin C2A confers Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent binding for membrane repair. *Structure* **22**:104–115. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.10.001>, PMID: 24239457
- Giraudo CG**, Eng WS, Melia TJ, Rothman JE. 2006. A clamping mechanism involved in SNARE-dependent exocytosis. *Science* **313**:676–680. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1129450>, PMID: 16794037
- Glowatzki E**, Fuchs PA. 2002. Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nature Neuroscience* **5**:147–154. DOI: <https://doi.org/10.1038/nn796>, PMID: 11802170
- Goutman JD**, Glowatzki E. 2007. Time course and calcium dependence of transmitter release at a single ribbon synapse. *PNAS* **104**:16341–16346. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0705756104>, PMID: 17911259

- Goutman JD.** 2012. Transmitter release from cochlear hair cells is phase locked to cyclic stimuli of different intensities and frequencies. *Journal of Neuroscience* **32**:17025–17036. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0457-12.2012>, PMID: 23175853
- Hams N, Padmanarayana M, Qiu W, Johnson CP.** 2017. Otoferlin is a multivalent calcium-sensitive scaffold linking SNAREs and calcium channels. *PNAS* **114**:8023–8028. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1703240114>, PMID: 28696301
- Heidelberger R, Heinemann C, Neher E, Matthews G.** 1994. Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* **371**:513–515. DOI: <https://doi.org/10.1038/371513a0>, PMID: 7935764
- Heidrych P, Zimmermann U, Kuhn S, Franz 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. *Human Molecular Genetics* **18**:2779–2790. DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp213>, PMID: 19417007
- Hell SW, Wichmann J.** 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters* **19**:780–782. DOI: <https://doi.org/10.1364/OL.19.000780>, PMID: 19844443
- Jackman SL, Turecek J, Belinsky JE, Regehr WG.** 2016. The calcium sensor synaptotagmin 7 is required for synaptic facilitation. *Nature* **529**:88–91. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature16507>, PMID: 26738595
- 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: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3491-12.2013>, PMID: 23467361
- Johnson CP, Chapman ER.** 2010. Otoferlin is a calcium sensor that directly regulates SNARE-mediated membrane fusion. *The Journal of Cell Biology* **191**:187–197. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.201002089>, PMID: 20921140
- Johnson SL, Franz C, Kuhn S, Furness DN, Rüttiger L, Münkner S, Rivolta MN, Seward EP, Herschman HR, Engel J, Knipper M, Marcotti W.** 2010. Synaptotagmin IV determines the linear  $Ca^{2+}$  dependence of vesicle fusion at auditory ribbon synapses. *Nature Neuroscience* **13**:45–52. DOI: <https://doi.org/10.1038/nn.2456>, PMID: 20010821
- Jung S, Maritzen T, Wichmann C, Jing Z, Neef A, Revelo NH, Al-Moyed H, Meese S, Wojcik SM, Panou I, Bulut H, Schu P, Ficner R, Reisinger E, Rizzoli SO, Neef J, Strenzke N, Haucke V, Moser T.** 2015. Disruption of adaptor protein 2 $\mu$  (AP-2 $\mu$ ) in cochlear hair cells impairs vesicle reloading of synaptic release sites and hearing. *The EMBO Journal* **34**:2686–2702. DOI: <https://doi.org/10.15252/embj.201591885>, PMID: 26446278
- 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. *Journal of Comparative Neurology* **521**:3260–3271. DOI: <https://doi.org/10.1002/cne.23345>, PMID: 23787810
- Kiang NY.** 1965. *Discharge Patterns of Single Fibers in the Cat's Auditory Nerve*. M.I.T. Press.
- Kremer JR, Mastronarde DN, McIntosh JR.** 1996. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *Journal of Structural Biology* **116**:71–76. DOI: <https://doi.org/10.1006/jsbi.1996.0013>, PMID: 8742726
- Krishnakumar SS, Radoff DT, Kummel D, Giraudo CG, Li F, Khandan L, Baguley SW, Coleman J, Reinisch KM, Pincet F, Rothman JE.** 2011. A conformational switch in complexin is required for synaptotagmin to trigger synaptic fusion. *Nature Structural & Molecular Biology* **18**:934–940. DOI: <https://doi.org/10.1038/nsmb.2103>, PMID: 21785412
- Lagarias JC, Reeds JA, Wright MH, Wright PE.** 1998. Convergence properties of the nelder–mead simplex method in low dimensions. *SIAM Journal on Optimization* **9**:112–147. DOI: <https://doi.org/10.1137/S1052623496303470>
- Lai Y, Diao J, Cipriano DJ, Zhang Y, Pfuetzner RA, Padolina MS, Brunger AT.** 2014. Complexin inhibits spontaneous release and synchronizes  $Ca^{2+}$ -triggered synaptic vesicle fusion by distinct mechanisms. *eLife* **3**:e03756. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.03756>, PMID: 25122624
- Lauterbach MA, Guillon M, Soltani A, Emiliani V.** 2013. STED microscope with spiral phase contrast. *Scientific Reports* **3**:2050. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep02050>, PMID: 23787399
- Le Calvez S, Avan P, Gilain L, Romand R.** 1998. CD1 hearing-impaired mice. I: Distortion product otoacoustic emission levels, cochlear function and morphology. *Hearing Research* **120**:37–50. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(98\)00050-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(98)00050-1), PMID: 9667429
- 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. *Journal of Neuroscience* **33**:5085–5094. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3560-12.2013>, PMID: 23516275
- Lek A, Evesson FJ, Sutton RB, North KN, Cooper ST.** 2012. Ferlins: regulators of vesicle fusion for auditory neurotransmission, receptor trafficking and membrane repair. *Traffic* **13**:185–194. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01267.x>, PMID: 21838746
- Lek A, Lek M, North KN, Cooper ST.** 2010. Phylogenetic analysis of ferlin genes reveals ancient eukaryotic origins. *BMC Evolutionary Biology* **10**:231. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-231>, PMID: 20667140
- 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. PMID: 9870944
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025714>, PMID: 21998683

- Li C, Ullrich B, Zhang JZ, Anderson RG, Brose N, Südhof TC. 1995. Ca(2+)-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature* **375**:594–599. DOI: <https://doi.org/10.1038/375594a0>, PMID: 7791877
- Li GL, Cho S, von Gersdorff H, Gersdorff H VON. 2014. Phase-locking precision is enhanced by multiquantal release at an auditory hair cell ribbon synapse. *Neuron* **83**:1404–1417. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.027>, PMID: 25199707
- 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. *Journal of Neuroscience* **31**:801–808. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3389-10.2011>, PMID: 21248103
- Lipstein N, Sakaba T, Cooper BH, Lin KH, Strenzke N, Ashery U, Rhee JS, Taschenberger H, Neher E, Brose N. 2013. Dynamic control of synaptic vesicle replenishment and short-term plasticity by Ca(2+)-calmodulin-Munc13-1 signaling. *Neuron* **79**:82–96. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.011>, PMID: 23770256
- Liu H, Bai H, Hui E, Yang L, Evans CS, Wang Z, Kwon SE, Chapman ER. 2014. Synaptotagmin 7 functions as a Ca<sup>2+</sup>-sensor for synaptic vesicle replenishment. *eLife* **3**:e01524. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.01524>, PMID: 24569478
- Longo-Guess C, Gagnon LH, Bergstrom DE, Johnson KR. 2007. A missense mutation in the conserved C2B domain of otoferlin causes deafness in a new mouse model of DFN9. *Hearing Research* **234**:21–28. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heares.2007.09.005>, PMID: 17967520
- Moser T, Beutner D. 2000. Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse. *PNAS* **97**:883–888. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.883>, PMID: 10639174
- Moser T, Brandt A, Lysakowski A. 2006. Hair cell ribbon synapses. *Cell and Tissue Research* **326**:347–359. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0276-3>, PMID: 16944206
- Neef A, Khimich D, Pirih P, Riedel D, Wolf F, Moser T. 2007. Probing the mechanism of exocytosis at the hair cell ribbon synapse. *Journal of Neuroscience* **27**:12933–12944. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1996-07.2007>, PMID: 18032667
- 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. *The Journal of Neuroscience* **34**:705–716. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3313-13.2014>, PMID: 24431429
- 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: <https://doi.org/10.1038/nn.2774>, PMID: 21378973
- Padmanarayana M, Hams N, Speight LC, Petersson EJ, Mehl RA, Johnson CP. 2014. Characterization of the lipid binding properties of Otoferlin reveals specific interactions between PI(4,5)P2 and the C2C and C2F domains. *Biochemistry* **53**:5023–5033. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi5004469>, PMID: 24999532
- 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. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(86\)90002-X](https://doi.org/10.1016/0378-5955(86)90002-X), PMID: 3759671
- 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. *Nature Neuroscience* **13**:869–876. DOI: <https://doi.org/10.1038/nn.2578>, PMID: 20562868
- Pawley JB. 2006. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer.
- Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel RD, Kalé L, Schulten K. 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry* **26**:1781–1802. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>, PMID: 16222654
- Poskanzer KE, Marek KW, Sweeney ST, Davis GW. 2003. Synaptotagmin I is necessary for compensatory synaptic vesicle endocytosis in vivo. *Nature* **426**:559–563. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02184>, PMID: 14634669
- 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: <https://doi.org/10.1074/jbc.M803605200>, PMID: 19004828
- Revelo NH, Kamin D, Truckenbrodt S, Wong AB, Reuter-Jessen K, Reisinger E, Moser T, Rizzoli SO. 2014. A new probe for super-resolution imaging of membranes elucidates trafficking pathways. *The Journal of Cell Biology* **205**:591–606. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.201402066>, PMID: 24862576
- Rizzoli SO, Betz WJ. 2005. Synaptic vesicle pools. *Nature Reviews Neuroscience* **6**:57–69. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrn1583>, PMID: 15611727
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.040>, PMID: 17055430
- 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: <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113705>, PMID: 22715884
- Safieddine S, Wenthold RJ. 1999. SNARE complex at the ribbon synapses of cochlear hair cells: analysis of synaptic vesicle- and synaptic membrane-associated proteins. *European Journal of Neuroscience* **11**:803–812. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00487.x>, PMID: 10103074

- Schnee ME**, Castellano-Muñoz M, Kong JH, Santos-Sacchi J, Ricci AJ. 2011a. Tracking vesicle fusion from hair cell ribbon synapses using a high frequency, dual sine wave stimulus paradigm. *Communicative & Integrative Biology* **4**:785–787. DOI: <https://doi.org/10.4161/cib.17822>, PMID: 22446556
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.06.004>, PMID: 16039566
- Schnee ME**, Santos-Sacchi J, Castellano-Muñoz M, Kong JH, Ricci AJ. 2011b. Calcium-dependent synaptic vesicle trafficking underlies indefatigable release at the hair cell afferent fiber synapse. *Neuron* **70**:326–338. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.031>, PMID: 21521617
- Schneggenburger R**, Han Y, Kochubey O. 2012. Ca<sup>2+</sup> channels and transmitter release at the active zone. *Cell Calcium* **52**:199–207. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.04.011>, PMID: 22682961
- Schnupp J**, Nelken I, King A. 2011. *Auditory Neuroscience: Making Sense of Sound*. MIT Press.
- Shao X**, Davletov BA, Sutton RB, Südhof TC, Rizo J. 1996. Bipartite Ca<sup>2+</sup>-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science* **273**:248–251. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.273.5272.248>, PMID: 8662510
- Shin OH**, Xu J, Rizo J, Südhof TC. 2009. Differential but convergent functions of Ca<sup>2+</sup> binding to synaptotagmin-1 C2 domains mediate neurotransmitter release. *PNAS* **106**:16469–16474. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0908798106>, PMID: 19805322
- Sinreich M**, Therrien C, Karpati G. 2006. Lariat branch point mutation in the dysferlin gene with mild limb-girdle muscular dystrophy. *Neurology* **66**:1114–1116. DOI: <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000204358.89303.81>, PMID: 16606933
- Söllner T**, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE. 1993. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* **75**:409–418. DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90376-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90376-2), PMID: 8221884
- 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. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* **5**:376–390. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10162-004-5003-8>, PMID: 15675002
- Strenzke N**, Chakrabarti R, Al-Moyed H, Müller A, Hoch G, Pangrsic T, Yamanbaeva G, Lenz C, Pan KT, Auge E, Geiss-Friedlander R, Urlaub H, Brose N, Wichmann C, Reisinger E. 2016. Hair cell synaptic dysfunction, auditory fatigue and thermal sensitivity in otoferlin Ile515Thr mutants. *The EMBO Journal* **35**:2519–2535. DOI: <https://doi.org/10.15252/embj.201694564>, PMID: 27729456
- 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. *Journal of Neuroscience* **29**:7991–8004. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0632-09.2009>, PMID: 19553439
- Sun J**, Pang ZP, Qin D, Fahim AT, Adachi R, Südhof TC. 2007. A dual-Ca<sup>2+</sup>-sensor model for neurotransmitter release in a central synapse. *Nature* **450**:676–682. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature06308>, PMID: 18046404
- Sutton RB**, Davletov BA, Berghuis AM, Südhof TC, Sprang SR. 1995. Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-binding fold. *Cell* **80**:929–938. DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90296-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90296-1), PMID: 7697723
- Südhof TC**. 2013. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* **80**:675–690. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.022>, PMID: 24183019
- Vincent PF**, Bouleau Y, Charpentier G, Emptoz A, Safieddine S, Petit C, Dulon D. 2017. Different CaV1.3 channel isoforms control distinct components of the synaptic vesicle cycle in auditory inner hair cells. *The Journal of Neuroscience* **37**:2960–2975. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2374-16.2017>, PMID: 28193694
- Vincent PF**, Bouleau Y, Petit C, Dulon D. 2015. A synaptic F-actin network controls otoferlin-dependent exocytosis in auditory inner hair cells. *eLife* **4**:e10988. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.10988>, PMID: 26568308
- 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. *Journal of Neuroscience* **34**:10853–10869. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0947-14.2014>, PMID: 25122888
- 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. *Journal of Cell Science* **128**:638–644. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.162099>, PMID: 25609709
- von Gersdorff H**, Matthews G. 1997. Depletion and replenishment of vesicle pools at a ribbon-type synaptic terminal. *Journal of Neuroscience* **17**:1919–1927. PMID: 9045721
- Wang J**, Bello O, Auclair SM, Wang J, Coleman J, Pincet F, Krishnakumar SS, Sindelar CV, Rothman JE. 2014. Calcium sensitive ring-like oligomers formed by synaptotagmin. *PNAS* **111**:13966–13971. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1415849111>, PMID: 25201968
- Webb B**, Sali A. 2014. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. In: *Current Protocols in Bioinformatics*. p. 5.6.1–5.6.5.
- 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. *The EMBO Journal* **33**:247–264. DOI: <https://doi.org/10.1002/embj.201387110>, PMID: 24442635

- Xu D**, Zhang Y. 2011. Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophysical Journal* **101**:2525–2534. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.10.024>, PMID: 22098752
- 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. *Nature genetics* **21**:363–369. DOI: <https://doi.org/10.1038/7693>, PMID: 10192385
- Zenisek D**, Steyer JA, Almers W. 2000. Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature* **406**:849–854. DOI: <https://doi.org/10.1038/35022500>, PMID: 10972279



# Article 2

**Viral transfer of mini-otoferlins partially restores the fast component of exocytosis and uncovers ultrafast endocytosis in auditory hair cells of otoferlin knock-out mice.**

**Tertrais M**, Bouleau Y, Emptoz A, Belleudy S, Sutton RB, Petit C, Safieddine S and Dulon D (2018)  
Journal of Neuroscience (sous presse)

**Introduction :**

La libération rapide et infatigable des vésicules synaptiques des cellules ciliées internes (CCI), implique l'activation de canaux calciques  $Ca_v1.3$  et l'intervention d'un senseur calcique à haute affinité, l'otoferline. L'otoferline se compose de six domaines C2 pouvant lier le  $Ca^{2+}$  et interagir avec les phospholipides, cependant le rôle particulier de chaque domaine C2 dans le cycle des vésicules synaptique est encore inconnu. Nous avons voulu ici caractériser le rôle de ces différents domaines C2 de l'otoferline, en utilisant des vecteurs viraux (AAV) permettant l'expression de quatre formes raccourcies de l'otoferline (mini-Otof, comportant les domaines C2-EF, C2-DEF, C2-ACEF ou C2-ACDF) *in vivo* dans les CCI de souris dépourvues d'otoferline (*Otof*<sup>-/-</sup>).

**Résultats :**

- L'audition des souris *Otof*<sup>-/-</sup> n'est pas restaurée suite à l'expression de ces mini-Otof. Ce phénotype s'explique par l'absence d'un recrutement des vésicules synaptique efficace aux zones actives
- L'expression des mini-Otof contenant les domaines C2-E et C2-F en C-terminal, permet une restauration partielle de l'exocytose rapide des vésicules synaptiques formant le RRP
- L'expression des mini-Otof C2-EF et C2-ACEF a permis de préserver partiellement la taille cellulaire des CCI ainsi que leur nombre de rubans synaptiques
- La composante rapide de l'inactivation du courant calcique portée par les isoformes courtes des canaux calciques ( $Ca_v1.3_S$ ) est restaurée en présence des mini-Otof C2-DEF, indiquant une interaction potentielle entre la partie C-terminale de l'otoferline et les isoformes courtes des canaux  $Ca_v1.3$ .
- L'expression des mini-Otof dans les CCI de souris *Otof*<sup>-/-</sup> a également permis de révéler et de restaurer une endocytose ultra-rapide ( $\tau \sim 20$  ms) dépendante de la dynamine et de l'otoferline.

**Conclusion :**

Notre étude montre que l'expression virale de formes raccourcies de l'otoferline peut restaurer efficacement l'exocytose rapide et transitoire des CCI de souris *Otof*<sup>-/-</sup>, mais ne peut cependant pas soutenir la libération des vésicules synaptiques lors de stimulations prolongées. L'utilisation de ces mini-Otof nous a permis de révéler une endocytose ultra-rapide dynamine et otoferline dépendante. Cette endocytose ultra-rapide apparaît comme essentielle à l'équilibre de la surface membranaire des CCI. Nous proposons alors un modèle dans lequel l'otoferline a un double rôle, à la fois dans l'exocytose et l'endocytose à la zone active des CCI.

**VIRAL TRANSFER OF MINI-OTOFERLINS PARTIALLY RESTORES  
THE FAST COMPONENT OF EXOCYTOSIS  
AND UNCOVERS ULTRAFAST ENDOCYTOSIS  
IN AUDITORY HAIR CELLS OF OTOFERLIN KNOCK-OUT MICE**

*Abbreviated title: Ultrafast endo- and exocytosis in cochlear hair cells*

*Author names and affiliation*

**Margot TERTRAIS<sup>1</sup>, Yohan BOULEAU<sup>1</sup>, Alice EMPTOZ<sup>2</sup>, Séverin BELLEUDY<sup>1</sup>, R  
Bryan SUTTON<sup>3</sup>, Christine PETIT<sup>3,4</sup>, Saaid SAFIEDDINE<sup>2,5\*</sup> and Didier DULON<sup>1\*#</sup>**

<sup>1</sup> *Neurophysiologie de la Synapse Auditive, Bordeaux Neurocampus, INSERM UMRS 1120, Université de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France*

<sup>2</sup> *Génétique et Physiologie de l'Audition, INSERM UMR 1120, Institut Pasteur, 75015 Paris, France*

<sup>3</sup> *Department of Cell Physiology and Molecular Biophysics, Texas Tech University Health Sciences Center, Lubbock Texas 99430, USA.*

<sup>4</sup> *Collège de France, 75005 Paris, France*

<sup>5</sup> *Centre National de la Recherche Scientifique*

\* Co-senior authors

# Corresponding author: didier.dulon@inserm.fr

- *Number of pages: 38*
- *9 figures and 3 tables*
- *Number of words for Abstract (245), Introduction (627) and Discussion (1496)*
- *Conflict of Interest: The authors declare no conflicts of interest.*
- *Acknowledgements: This work was supported by a grant from the Fondation Pour l'Audition (to DD) The European Commission (ERC-2011-ADG\_294570) and LabEx Lifesenses (ANR-10-LABX-65).*

## ABSTRACT

Transmitter release at auditory inner hair cells (IHCs) ribbon synapses involves exocytosis of glutamatergic vesicles during voltage-activation of L-type  $Ca_v1.3$  calcium channels. At these synapses, the fast and indefatigable release of synaptic vesicles by IHCs is controlled by otoferlin, a six-C2 (A-F) domain protein that functions as a high affinity  $Ca^{2+}$  sensor. The molecular events by which each otoferlin C2-domain contributes to the regulation of the synaptic vesicle cycle in IHCs are still incompletely understood. Here, we investigated their role using a cochlear viral cDNA transfer approach *in vivo* where IHCs of mouse lacking otoferlin (*Otof*<sup>-/-</sup> mice of both sexes) were virally transduced with cDNAs of various mini-otoferlins. Using patch-clamp recordings and membrane capacitance ( $C_m$ ) measurements, we show that the viral transfer of mini-otoferlin containing C2-ACEF, C2-EF or C2-DEF partially restores the fast exocytotic component in *Otof*<sup>-/-</sup> mice IHCs. The restoration was much less efficient with C2-ACDF, underlining the importance of the C2-EF domain. None of the mini-otoferlins tested restored the sustained component of vesicle release, explaining the absence of hearing recovery. The restoration of the fast exocytotic component in the transduced *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs was also associated with a recovery of  $Ca^{2+}$  currents with normal amplitude and fast time inactivation, confirming that the C-terminal C2 domains of otoferlin are essential for normal gating of  $Ca_v1.3$  channels. Finally, the reintroduction of the mini-otoferlins C2-EF, C2-DEF, or C2-ACEF allowed us to uncover and characterize for the first time a dynamin-dependent ultrafast endocytosis in IHCs.

### Significance Statement

Otoferlin, a large six-C2 domain protein, is essential for synaptic vesicle exocytosis at auditory hair cell ribbon synapses. Here, we show that the viral expression of truncated forms of otoferlin (C2-EF, C2-DEF, or C2-ACEF) can partially rescue the fast and transient release component of exocytosis in mouse hair cells lacking otoferlin yet cannot sustain exocytosis after long repeated stimulation. Remarkably, these hair cells also display a dynamin-dependent ultrafast endocytosis. Overall, our study uncovers the pleiotropic role of otoferlin in the hair cell synaptic vesicle cycle, notably in triggering both ultrafast exo- and endocytosis and recruiting synaptic vesicles to the active zone.

## INTRODUCTION

Sound encoding into electrical nerve impulses by inner hair cell (IHC) ribbon synapse is a step crucial to normal hearing. Each of 10 to 20 active zones per IHC is able to drive the spiking rate of its corresponding afferent auditory nerve fiber up to the kHz range and maintain its firing rate at several hundred Hz during sustained sound stimulation (Kiang 1965; Palmer and Russel, 1986; Taberner and Liberman, 2005). To faithfully achieve this encoding process, synaptic vesicle release at the IHC active zones must occur with high temporal precision as well as reach and sustain extremely high rate of exocytosis, which places an extraordinary demand on the molecular machinery responsible for vesicle recycling (see, for review, Moser et al., 2006). Despite its great importance in maintaining membrane homeostasis and sustained vesicle release at the IHC active zone, the precise mechanism by which exocytosed vesicles are rapidly recycled through endocytosis remains largely unknown.

In central nervous system synapses, synaptotagmin I and II – proteins with one N-terminal trans-membrane region and two C-terminal C2 domain (C2-A and C2-B), are known to serve as essential calcium sensors for vesicle exocytosis and transmitter release (Chapman et al., 2008; Südhof et al., 2012). Although synaptotagmins are transiently expressed in immature spiking IHCs (before the onset of hearing in mice), these neuronal  $Ca^{2+}$  sensors are not involved in mature IHCs (Beurg et al., 2010). It is otoferlin, a large protein having six C2 domains (C2A-F) and a single transmembrane domain at its C-terminal end (Fig.1), that serves as  $Ca^{2+}$  sensor for vesicle exocytosis in cochlear (Roux et al., 2006; Michalski et al., 2017) and vestibular hair cells (Dulon et al., 2009). However, the precise molecular events by which each otoferlin C2-domains contribute to the synaptic vesicle cycle is still incompletely understood.

Otoferlin has also been suggested to have a role in vesicle clathrin-dependent endocytosis, based on its interaction with AP-2 adaptor protein complex (Duncker et al., 2013; Jung et al., 2016; Selvakumar et al., 2017) and on a reduced membrane trafficking at the ribbon active zone in *Otof*<sup>-/-</sup> mice (Revelo et al., 2014). Different modes of endocytosis seem to coexist in IHCs since different kinetics for membrane retrieval have been observed: one fast (with a time constant of several hundreds of ms; Neef et al. 2014; Vincent et al., 2014; Michalski et al., 2017) and one slow (with a 10-20 s time constant) (Moser and Beutner, 2000; Beutner et al., 2001; Cho et al., 2011). Neither of these modes of endocytosis

are likely sufficiently fast to support the extremely high rate of exocytosis occurring in IHCs. A much faster compensatory endocytosis, which remains to be identified, must take place in IHCs to maintain the active zone's original surface area and prevent depletion of vesicle pools.

Recent studies from invertebrate neuromuscular junctions (Watanabe et al., 2013a) and mouse hippocampal synapses (Watanabe et al., 2013b, 2014), using high-pressure freezing EM paired with optogenetic stimulation, showed that synaptic vesicles can be recycled extremely rapidly via clathrin-independent ultrafast endocytosis, with a time constant in the tens of milliseconds range. Here, we examined whether such an ultrafast endocytosis, which has been shown to be dynamin and actin dependent (Delvendahl et al., 2016; Watanabe et al., 2014), occur in mouse IHCs. Furthermore, we explored the role of various C2 domain combinations in IHC exo/endocytosis by using an *in vivo* cochlear viral cDNA transfer of various mini-otoferlin constructs in mice lacking otoferlin (Fig. 1). We found that the viral expression of mini-otoferlins that contain the C-terminal C2-E and C2-F domains, induced a restoration of the fast component of synaptic vesicle exocytosis in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs but not the sustained component during repeated stimulations. Also, the reintroduction of these mini-otoferlins allowed us to uncover a novel ultrafast endocytosis mechanism in IHCs.

## METHODS

### *Viral vector constructs*

The murine cDNA corresponding to the mini-*Otof* C2-EF (1896 bp; aa 1364-1996), C2-DEF (2763 bp; aa 960-1996), C2-ACDF (3465 bp) or C2-ACEF (3432 bp) domains of otoferlin were cloned into an AAV8.CB6.PI.rBG plasmid (p1045; Penn Vector Core) (Fig. 1A). The C2-ACEF construct contains three disruptions: 125 $\Delta$ 394 (in aa) containing the C2-B domain, 946 $\Delta$ 1490 containing the C2-D domain and 1695 $\Delta$ 1731 between the C2-E and C2-F. The C2-ACDF construct contains two disruptions: 125 $\Delta$ 394 containing the C2-B domain and 1110 $\Delta$ 1679 containing the C2-E domain. These mini-*Otof* C2-ACEF or C2-ACDF sequences were designed with a similar structure-based method developed for dysferlin (Llanga et al., 2017). Each C2 domains was analyzed by predicted  $\beta$  strands, potential  $\text{Ca}^{2+}$ -binding residues, C2 domain topology and length and continuity of the hydrophobic packing in the core of the domain. Then, the otoferlin sequence was edited *in silico* by defining excision sites. The absolute boundaries for each of the six C2 domains of the mouse otoferlin protein were selected based on several factors. The approximate locations of each C2 domain could be delineated based on the output from the SMART database. This server (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) can identify the presence of each domain; however, the structural boundaries are not necessarily clear. With the approximate boundaries defined, each domain was aligned and sorted against an extensive library of known Type 1 and Type 2 C2 domain ferlins. The resulting phylogenetic tree sorted each otoferlin C2 domain according to their most likely topology. Once the topology was defined, each of the eight beta-strands were located by aligning the known ‘in-out-in-out’ periodicity characteristic of C2 domain beta-strands. This time-consuming method reduces the risk of mis-defining a large loop insertion as alpha- or beta-secondary structure that may actually be unique to an individual C2 domain. Once the accurate boundaries of each C2 were established, two mini-*Otof* were constructed by excluding individual domains and linker regions. Only C2-A, the central FerA domain, C2-F and the transmembrane span were left intact. Two shorter genes that could be accommodated within an AAV virus were constructed using these rules: *Otof* C2-ACEF and *Otof* C2-ACDF. The coding sequence of each mini-*Otof* was synthesized (GeneCust Europe, – Luxembourg), subcloned into AAV2 genome and packaged in AAV8 capsid as described in (Emptoz et al., 2017).

The expressions of these different mini-*Otof* genes were all driven by the CB6 promoter (1 kb). Because of the 4.8 kilobases packaging limit of the AAV8 vector, only the sequence of the mini-*Otof* C2-EF was followed by an internal ribosome entry site (IRES; 0.6 kb) and the eGFP reporter gene (0.7 kb), allowing a direct monitoring of transfected IHCs (Fig. 1B). The transduction of mini-*Otof* C2-EF and C2-DEF was assessed by confocal immuno-microscopy, while the expression of mini-*Otof* C2-ACEF and ACDF was determined by RT-PCR (see below).

#### *Round window membrane injection*

The AAV8 vector containing the mini-*Otof* sequences was injected in the cochlea at a titer of  $3.21 \times 10^{13}$  genome copies (gc)/ml and the AAV8.CB6.eGFP with no inserted mini-otoferin gene was used as control at a titer of  $3.34 \times 10^{13}$  gc/ml. Protocols were approved by the Animal Care and Use committee of the Institut Pasteur and the University of Bordeaux. Intracochlear viral transduction was carried out as previously described (Akil et al. 2015; Emptoz et al., 2017; Dulon et al., 2018). Mice were anesthetized using hypothermia exposure. A left post-auricular incision was made to expose the otic bulla and to visualize the cochlea. A glass micropipette containing 1  $\mu$ l of AAV vector preparation was inserted through the round window membrane (RWM) and injected into the cochlea. The pipette was removed, the hole in the membrane was covered with connective tissue, and the incision was sealed with biological glue (3M Vetbond). Standard post-operative care was applied.

#### *Auditory Brainstem Responses*

To record ABRs (Auditory Brainstem Responses, which represent the sound-evoked synchronous firing of the auditory cochlear nerve fibers) as well as distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs, which reflect the amplification provided by OHCs), mice were anesthetized with intraperitoneal injection of xylazine (6 mg/ml) and ketamine (80 mg/ml) mixture (Rompun, #KP091XW and Vibrac, #4C14) diluted in physiological saline. The mouse body temperature was kept constant at 37°C. For stimulus generation and data acquisition, we used a TDT RZ6/BioSigRZ system (Tucker-Davis Technologies). ABR signals were averaged after the presentation of a series of 512 stimulations. ABR thresholds were defined as the lowest stimulus for recognizable wave-I and II. The amplitude of ABR wave-I was estimated by measuring the voltage difference between the positive (P1) and



negative (N1) peak of wave-I. Pure tone stimuli were used at frequencies of 4, 8, 16, 24 and 32 kHz. Sound intensities of 10 to 90 dB SPL, in 10 dB step, were tested (Fig. 2).

#### *Tissue preparation of the organ of Corti*

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 xylazin (6 mg/ml) and ketamine (80 mg/ml) mixture (Rompun, #KP091XW and Vibrac, #4C14) diluted in physiological saline. Electrophysiological recordings from IHCs were obtained in whole-mount organ of corti (OC) from mice at postnatal days 15–21 (P15 – P21); that is, after the onset of hearing. The OC was freshly dissected under binocular microscopy 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 then 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 coupled to a C2 confocal fluorescent imaging system. The extracellular solution was complemented with 0.25 μM of apamin (Latoxan; cat # L8407) and 1 μM of XE-991 (Tocris Bioscience; cat # 2000) to block SK channels and KCNQ4 channels, respectively. The external Ca<sup>2+</sup> concentration was increased from 1.3 to 5 mM to enhance the amplitude of Ca<sup>2+</sup> currents to levels nearby body temperature. All experiments were performed at room temperature (22°C–24°C).

#### *Patch-clamp 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, using an EPC10 amplifier controlled by Patchmaster pulse software (HEKA Elektronik). For the mini-*Otof* C2-EF experiments, only eGFP expressing IHCs were recorded. For the other mini-*Otof* experiments, in absence of eGFP fluorescent signaling, IHCs were randomly recorded in the tissue preparation. 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 2 to 4 MΩ. Patch pipettes were filled with an intracellular cesium-based solution containing (in mM): CsCl 145; MgCl<sub>2</sub> 1; HEPES 5; EGTA 1; TEA 20; ATP 2 and GTP 0.3; pH 7.2, 300

mOsm. Changes in cell membrane capacitance ( $\Delta C_m$ ) were used to monitor fusion of synaptic vesicles during exocytosis.  $C_m$  was measured accordingly to the Lindau-Neher technique (Lindau and Neher, 1988) by using the Lock-in amplifier Patchmaster software (HEKA) and applying a 1 kHz command sine wave (amplitude 20 mV) at holding potential (-80 mV) before and after the pulse experiment. Because recording conditions can greatly influence capacitance measurements, only IHC patch clamp recordings with low series resistance below 10 m $\Omega$  and a maximum leak current of 25 pA (at  $V_h = -80$  mV), were considered in the present study.

### *Voltage stimulation*

Three protocols were used. First, readily releasable pool (RRP) exocytosis was recorded during a protocol in which IHCs were depolarized from -80 mV to -10 mV with increasing durations from 5 to 40 ms in 5 ms increments. Second, RRP exocytosis was also recorded during a protocol of 5 consecutive stimulations of 20 ms, each separated with 100 ms time inter-pulse. Third a protocol probing the replenishment of the synaptic zone in vesicles where IHCs were depolarized during a train of 100 ms pulses from -80 mV to -10 mV.

### *Intracellular $Ca^{2+}$ uncaging*

To trigger a fast increase in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration from the caged  $Ca^{2+}$  chelator DM-nitrophen (Interchim; cat # 317210), we used 100 ms brief flashes from a 365 nm UV light source delivered by a Mic-LED-365 (350 mW, Prizmatix). The UV LED was directly connected to the epi-illumination port at the rear of the upright Nikon FN1 microscope and illumination focalized through the 60X objective (CFI Fluor 60X WNIR, WD = 2.0 mm, NA = 1). Hair cells were loaded with in mM, CsCl 145; HEPES 5; TEA 20; DM-nitrophen 10;  $CaCl_2$  10. After rupture of the patch, we waited systematically for 2 min at holding potential of -70 mV to load and equilibrate the cells with the intra-pipette solution. Upon UV photolysis, the changes in  $[Ca^{2+}]_i$ , continuously measured with a C2 confocal system and NIS-elements imaging software (Nikon) coupled to the FN1 microscope, reached nearly a mean maximum value of  $20 \pm 5$   $\mu$ M within 15-20 ms (Michalski et al., 2017); a value that was not different between WT and *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs, as previously shown by Vincent et al., 2005.

### *Dyngo-4a application*

For each set of experiment, during voltage stimulation or  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging, control recordings ( $I_{\text{Ca}}$  and  $\Delta C_m$ ) were obtained in the same organ of Corti first bathing in normal perilymph and then 30  $\mu\text{M}$  of Dyngo-4a (dynamamin inhibitor from Abcam; cat # ab120689) was added for 20 min prior recording its effect on  $I_{\text{Ca}}$  and  $\Delta C_m$ .

### *Immunostaining and confocal microscopy*

Rapidly dissected P15-P21 mouse cochleae were fixed with cold 4% paraformaldehyde (PFA) at 4°C overnight. Once washed with cold phosphate buffered saline (PBS), they were decalcified several hours in 10% EDTA buffered with PBS. After PBS washing, whole bones were removed and Reissner and tectorial membranes were carefully removed to open scala media and allow efficient antibodies access to the organ of Corti (OC). Tissues were first incubated with PBS containing 30% normal horse serum and 0.5% triton X-100 for 1 hour 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.

Synaptic ribbons were labeled either with a goat polyclonal anti-CtBP2 (Santa Cruz, USA; cat # SC-5966; RRID:AB\_2086774); the otoferlin C-ter part was labeled with a rabbit polyclonal antibody (Roux et al., 2006). Once washed with PBS, tissues were incubated with secondary antibodies suitable mix at 1:500 during 2 hours at RT: donkey anti-rabbit Alexa 488 (Abcam, UK; cat # ab150061; RRID:AB\_2571722), donkey anti-goat Fluorophores 547H (Interchim, France; cat # FP-SB2110; RRID\_AB2744533). To identify and localize the hair cells in our surface preparation of the organ of Corti, F-actin (highly concentrated in the hair cell stereocilia) was stained using tagged Phalloidin Fluorophore 405 (1:200, Interchim, France; cat # FP-CA9870). To better visualize the ribbons and otoferlin in our images, the fluorescent channel of F-actin labeling was not shown.

After PBS washing, OC surface preparations were mounted on Superfrost slides in ProLong Antifade mounting medium (Molecular Probes, USA, cat # P7481) and kept in dark at -20°C until observation. All comparative immunoreactions were performed simultaneously on the same days in rigorously identical conditions.

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

power 60 %, scan rate 700 Hz, scans averaged per XY section 4 times, step size 800 nm, pixel size 103 nm giving an X-Y image size of 53 x 53  $\mu\text{m}$  (512 x 512 pixels). Images were analyzed with ImageJ software (W.S. Rasband, NIH, Bethesda, USA).

#### *RT-PCR to detect C2-ACEF and C2-ACDF transcripts*

Apical turns of 2 OCs from P50 *Otof*<sup>-/-</sup> or *Otof*<sup>-/-</sup> injected with otoferlin C2-ACEF or C2-ACDF constructs mice were freshly dissected and stored in separate low-DNA-binding tubes containing 1  $\mu\text{l}$  of RNase inhibitor (Amresco, catalog #E633) maintained in dry ice. Total RNA was extracted from tissues using the RNeasy protocol (Molecular Research Center, catalog #RN 190). mRNA were purified using Dynabeads™ mRNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific, catalog # 61006), and reverse transcribed to cDNA by using the oligodT primers linked to the magnetic beads and AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase (Stratagene, catalog #600107). RT was performed at 37°C overnight. Specific PCR amplification was performed by using 0.45  $\mu\text{g}$  of cDNA and Herculase II Fusion DNA Polymerase (Stratagene, catalog #600677). Specific sense and antisense primers (Eurofins Genomics) are summarized in Table 1.

#### *Data Analysis*

Data were analyzed using ImageJ, Patchmaster (HEKA Elektronik, Germany) and Origin 9.1 (OriginLab). Statistical analysis were performed using independent two-sample Student's *t* test and for multiple comparisons using either one-way ANOVA (two-way ANOVA in the case of Fig. 3B, C and G) followed by Tukey's post-hoc test for normally distributed data or the nonparametric Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test for not normally distributed data. Means are expressed  $\pm$  SEM. In the graphs, \* indicates statistical significance with  $p < 0.05$ . A statistical F-test was used to compare the exocytotic curve efficiency in Fig. 3E.

## RESULTS

### Viral transfer of mini-*Otof* cDNAs in hair cells lacking otoferlin

A single intracochlear viral injection of various AAV8 vectors containing different mini-otoferlin cDNA constructs (mini-*Otof*) was performed in wild type (WT) control mice and in mice lacking otoferlin (*Otof*<sup>-/-</sup> mice) on postnatal days P1-P3 (Fig.1 A,B). Four mini-*Otof* were designed and tested in regards to the following criteria: first, a synaptotagmin-like structure, i.e. a mini-*Otof* containing only two C2 domains (C2-EF) attached to the C-terminal transmembrane domain; second, a structure similar to the short human otoferlin isoform, i.e. containing the three last C-terminal C2 domains (C2-DEF) but lacking the FerA domain (Yasunaga et al., 2000); and third, two predicted abridged otoferlin-like containing C2-ACEF or C2-ACDF domain were designed, using 3D-structural modeling similar to nano-dysferlin (Llanga et al., 2017).

The rate of hair cell transduction efficacy of the mini-*Otof* C2-EF-IRES-eGFP was first evaluated on postnatal days P15-P21 by counting eGFP-expressing hair cells (Fig. 1C, D). It is to be noted that in order to avoid a possible inhibitory effect of eGFP on the function of mini-C2-EF otoferlin, as previously observed when eGFP is attached to Syt 1 (Han et al., 2005), we added an internal ribosome entry site (IRES) between the two coding sequences in the viral vector (Fig. 1A). This IRES sequence allowed then a separate expression of the mini-*Otof* C2-EF and eGFP under the CB6 promoter. We found that, all along the cochlear partition, the eGFP transduction was essentially associated with the sensory hair cells of the organ of Corti, with a much higher rate for inner hair cells (IHCs) as compared to outer hair cells (OHCs):  $80.4 \pm 2.3$  % and  $29.5 \pm 3.5$  %, respectively (unpaired t-test  $p < 10^{-4}$ ;  $n = 22$  cochleae) (Fig. 1D). It is to be noted that the eGFP transduction in IHCs reached higher percentage (above 90 %) at the apical portion of the organ of Corti. In addition, the expression of the mini-*Otof* C2-EF and C2-DEF in *Otof*<sup>-/-</sup> hair cells was directly assessed under confocal immunofluorescence microscopy at P15-P21 by using a specific antibody against the C-terminal of otoferlin (Roux et al., 2006). At the apical turn of the injected cochlea, where most of electrophysiological recordings were performed, an average of  $95 \pm 5$  % of IHCs were found to express the mini-*Otof* C2-EF ( $n = 3$  mice) and DEF ( $n = 14$  mice). The subcellular distribution of these mini-*Otof* proteins was similar to the native otoferlin in wild-type mice, with a preferential higher expression in the basolateral area of IHC where the ribbon synapses are located (Fig. 1E). Since the C2-ACEF and C2-ACDF constructs contain

various disruption in their encoding amino acid sequences (see Methods), rendering their immuno-detection impossible with the various otoferlin antibodies currently in our hands, their expression in the organ of Corti was positively assessed at the mRNA level by RT-PCR (see Methods; data not shown).

### **Absence of auditory function recovery by cochlear injection of mini-*Otof* cDNAs**

Mice lacking otoferlin (*Otof*<sup>-/-</sup> mice) are profoundly deaf due to a defect in synaptic vesicle release at the IHC ribbon synapse (Roux et al., 2006; Fig. 2). Measurements of auditory brainstem responses (ABRs) were performed to evaluate a possible recovery in auditory function in AAV8-mini-*Otof* injected *Otof*<sup>-/-</sup> mice. As a sham we first verified that cochlear injection of AAV8-eGFP not containing the mini-*Otof* cDNAs did not affect hearing sensitivity of WT mice (Fig. 2A green trace). The input-output function (click ABR-wave-I amplitude as a function of sound intensity; Fig. 2B) as well as the thresholds at different frequencies were similar between control WT sham-injected mice and WT non-injected mice (Fig. 2C). Furthermore, we found that hearing thresholds of WT mice were not affected for up to three months after cochlear injection, indicating the innocuity of the surgical and viral procedures, as previously reported (Emptoz et al., 2017; Dulon et al., 2018). The distortion-product otoacoustic emissions (DPOAEs) of WT mice, which probe the activity of outer hair cells (OHCs), also remained unaffected by viral injections (data not shown). Cochlear injection of the various AAV8-mini-*Otof* tested, C2-EF (n = 22 mice), C2-DEF (n = 42 mice), C2-ACEF (n = 13 mice), C2-ACDF (n = 8 mice) or C2-ACEF together with C2-ACDF (n = 5 mice), did not rescue the hearing phenotype in *Otof*<sup>-/-</sup> mice. These mice were tested for up to three months post-injection. These results suggested that the cochlear injection of the various mini-*Otof* tested did not restore normal synaptic exocytotic properties of *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs.

### **Viral transfer of mini-*Otof* in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs partially restores exocytosis of the readily releasable pool of vesicles but not its vesicle resupply**

Although the measurement of auditory evoked potential (ABRs) is a good method to determine the overall integrity of the auditory system, this method is not precise enough to detect subtle changes in auditory function, notably those associated with certain synaptopathies produced by noise exposure and aging which are thus classified as "hidden hearing loss" (Liberman, 2017). In this context, and in a reverse way, it is possible that subtle synaptic recovery after mini-*Otof* injections in *Otof*<sup>-/-</sup> mice cannot be detected in ABRs

recordings. To assess whether IHC exocytosis was somewhat improved in mini-*Otof* injected *Otof*<sup>-/-</sup> mice, we directly recorded IHCs using whole-cell patch clamp experiments. The study of the presynaptic exocytotic function in IHCs was carried out at P15-P21 in organ of Corti explants dissected either from WT (*Otof*<sup>+/+</sup>) or *Otof*<sup>-/-</sup> mice injected with various AAV8-mini-*Otof* (Fig. 1). All IHC patch-clamp recordings were performed in the 20–40% normalized distance from the apex, an area encoding sound frequencies ranging from 8 to 16 kHz.

First, we controlled the innocuity of the viral construct on IHC exocytosis. Recordings from P15-P21 WT IHCs of the virally injected cochlea with AAV8-eGFP (with no inserted mini-*Otof* = sham-injected mice) displayed similar exocytotic responses as compared to P15-P21 WT IHCs from non-injected cochleae. Indeed, for a 15 ms voltage step, from -80 to -10 mV, AAV8-eGFP transduced IHCs showed a mean capacitance jump of  $6.0 \pm 1.4$  fF (n = 6), a value comparable to WT IHCs from non-injected mouse cochleae ( $6.7 \pm 1.0$  fF, n = 6, unpaired t-test p = 0.71; data not shown). We also found no significant difference in the exocytotic responses between IHCs from WT sham-injected and WT non-injected mice for longer and repetitive depolarizing steps that involve vesicle recruitment (data not shown). As expected, we observed no rescue effect on exocytosis in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs. For a 15 ms voltage step, from -80 to -10 mV, *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs transduced with AAV8-eGFP showed a mean capacitance jump of  $0.83 \pm 0.5$  fF (n = 6), a value comparable to *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs from non-injected mouse cochleae ( $1.5 \pm 0.4$  fF, n = 13, unpaired t-test p = 0.38). Since IHCs from sham-injected mice displayed exocytotic properties similar to IHCs from non-injected mice, these data were combined and used as controls. Controls were named WT or *Otof*<sup>-/-</sup> in the rest of the study.

Conversely, recordings from *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs of the virally injected cochleae with AAV-*Otof*-C2-EF-IRES-eGFP displayed a partial rescue of exocytosis when stimulated with brief depolarization impulses lasting less than 20 ms (Fig. 3A-B-D). These brief voltage-impulses are believed to mobilize the readily-releasable pool (RRP) of vesicles at the active zones of the IHCs (Moser and Beutner, 2000; Michalski et al., 2017). For a 25 ms-impulse from -80 mV to -10 mV, exocytosis in *Otof*-C2-EF transduced IHCs, directly visualized with eGFP fluorescence, averaged  $3.8 \pm 0.8$  fF (n = 14; from 6 mice issued from 3 different litters), a value significantly larger than littermate non-injected and sham (control) *Otof*<sup>-/-</sup> mice ( $1.5 \pm 0.4$  fF; one-way ANOVA, P =  $2.25 \cdot 10^{-10}$ , post-hoc Tuckey's test p = 0.045) but significantly smaller than control WT IHCs ( $10.3 \pm 1.4$  fF; one-way ANOVA, post-hoc Tuckey's test p =

$4.6 \cdot 10^{-6}$ , Fig. 3A-C). The kinetics of exocytosis *Otof*-C2-EF transduced IHCs were significantly higher than in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (two-way ANOVA,  $P = 6.8 \cdot 10^{-13}$  and post-hoc Tukey's test  $p = 1.8 \cdot 10^{-8}$ ; Fig. 3B).

A similar partial rescue of exocytosis was obtained in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs from *Otof*-C2-DEF virally injected cochlea (Fig. 3A-C; data from 4 mice of 3 different litters). Note that in this latter set of experiments with *Otof*-C2-DEF, in the absence of eGFP (because of the size limit of cDNA insertion in the AAV vector, see Methods), randomly selected IHCs were recorded in the organ of Corti. Only 1 out of 7 IHCs did not show a significant increase in exocytosis as compared to non-injected *Otof*<sup>-/-</sup> mice. This high rate of exocytosis rescue in AAV-*Otof*-C2-DEF injected cochleae was consistent with the high percentage (> 90 %) of IHCs expressing the mini-otoferlin protein (Fig. 1E). The kinetics of exocytosis for *Otof*-C2-DEF transduced IHCs were significantly higher than in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (two-way ANOVA,  $P = 6.8 \cdot 10^{-13}$ , post-hoc Tukey's test  $p = 1.7 \cdot 10^{-3}$ , Fig. 3C).

Remarkably, recordings from *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs of AAV-*Otof*-C2-ACEF injected cochlea displayed a more efficient rescue of exocytosis when stimulated with brief depolarizing impulses lasting less than 20 ms (Fig. 3A-B). Only one out of ten IHCs recorded from AAV-*Otof*-C2-ACEF injected mice did not produce a  $\Delta C_m$  response different from *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs of non-injected cochleae, again a result in good agreement with the high percentage of transduced IHC (Fig. 1C,D). The kinetics of exocytosis for *Otof*-C2-ACEF were significantly higher than in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (two-way ANOVA,  $P = 6.8 \cdot 10^{-13}$ ,  $p < 10^{-4}$ , Fig. 3B). The kinetics of exocytosis with *Otof*-C2-ACDF were also found significantly higher than in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (two-way ANOVA,  $P = 6.8 \cdot 10^{-13}$ ,  $p = 2.2 \cdot 10^{-3}$ , Fig. 3C).

The most common method to quantify the RRP is to fit the data with a single exponential function, with time constant ( $\tau$ ) giving 63.2% of the RRP value. For WT-control IHCs, we found a RRP value of  $19.3 \pm 2.6$  fF with  $\tau = 29.5 \pm 6.5$  ms. In our experimental conditions, while the data of *Otof*-C2-EF (RRP =  $5.0 \pm 0.8$  fF with  $\tau = 15.5 \pm 7.3$  ms), *Otof*-C2-ACEF (RRP =  $5.9 \pm 0.3$  fF with  $\tau = 8.5 \pm 1.9$  ms) and *Otof*-C2-DEF (RRP =  $4.5 \pm 0.5$  fF with  $\tau = 19.0 \pm 5.2$  ms) could be fitted with a single exponential, we could not accurately fit the data of *Otof*-C2-ACDF and *Otof*<sup>-/-</sup> with such a function and therefore determine a RRP value for these conditions. Therefore, to be able to statistically compare all viral conditions and controls within a single one-way ANOVA test, we instead compared the initial rate of RRP exocytosis. This RRP rate was obtained for each conditions by fitting the first four time-points of each



kinetics with a linear function. All mini-*Otof*, except *Otof*-C2-ACDF, showed a significant increase in the rate of the RRP exocytosis as compared to *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (Fig. 3D and Table 2). The Ca<sup>2+</sup> efficiency of RRP exocytosis ( $\Delta C_m/Q_{Ca}$ ;  $Q_{Ca}$  defined as the integral of the Ca<sup>2+</sup> current) in *Otof*-C2-ACEF IHCs was also found similar to WT controls for brief depolarizations lasting up to 15 ms: with a mean slope of  $2.77 \pm 0.21$  fF/pC and of  $2.09 \pm 0.28$  fF/pC, respectively (Fig. 3E; F-test with  $F = 2.18$ ,  $p = 0.23$ ). These results indicated that the abridged short otoferlin, *Otof*-C2-ACEF, was able to trigger fast vesicular membrane fusion as efficiently as the native six-C2 otoferlin.

However, *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs treated with the mini-*Otof*, although showing partial recovery of the RRP release, could not efficiently sustain exocytosis for voltage-impulses during a train of stimulation as compared to WT IHCs (Fig. 3F,G), suggesting a defect in the vesicle pool replenishment process. The Ca<sup>2+</sup> efficiency of exocytosis ( $\Delta C_m/Q_{Ca}$ ) measured for voltage-steps beyond 20 ms up to 40 ms was significantly reduced from  $1.69 \pm 0.29$  fF/pC in WT to  $0.56 \pm 0.14$  fF/pC in *Otof*-C2-ACEF IHCs (Fig. 3E; F-test with  $F = 16.0$ ,  $p = 0.0039$ ). The replenishment rate, calculated during a train of depolarization, was reduced by a factor 3 to 5 as compared to WT IHCs, although significantly larger, except for *Otof*-C2-ACEF, than *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs from non-injected mice (Fig. 3G). This defect in the vesicle pool resupply to the RRP, found also in the *pachanga* mice model with a point mutation in C2-F (Pangrsic et al., 2010), explains the absence of ABR waves in these Mini-*Otof* injected mice (Fig. 2).

### **Mini-*Otof* constructs partially restores the fast Ca<sup>2+</sup> current inactivation in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs**

Cochlear IHCs have been shown to express long and short C-terminal Ca<sub>v</sub>1.3 isoforms (Scharinger et al., 2015, Vincent et al., 2017). Short C-terminal Ca<sub>v</sub>1.3 channels isoforms (Ca<sub>v</sub>1.3<sub>S</sub>) lacking the C-terminal modulator (Bock et al., 2011) are rapidly inactivated by calmodulin (CaM) and are thought to carry the fast component of Ca<sup>2+</sup> current inactivation in IHCs (representing 15-30 % of the total calcium current; Vincent et al., 2017; Fig. 4A). The distal and proximal C-terminal regulatory domains (PCRD and DCRD) of long Ca<sub>v</sub>1.3 isoforms (Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub>) compete with CaM and these channels do not present fast inactivation. These Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub> likely support the major part of the Ca<sup>2+</sup> current in IHCs (Fig. 4A; Vincent et al., 2017). Unlike WT-IHCs, IHCs lacking otoferlin display Ca<sup>2+</sup> currents with weak or no inactivation, suggesting that otoferlin is required for the functional expression of Ca<sub>v</sub>1.3<sub>S</sub> isoforms in IHCs (Vincent et al., 2017; Fig. 4B,4D). WT-IHCs displayed a fast inactivating component with an amplitude of  $20 \pm 4$  pA with  $\tau = 20.3 \pm 3.3$  ms, when fitting the first 50

ms of the current trace with a single exponential function, an amplitude significantly larger as compared to *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs ( $5 \pm 2$  pA; Kruskal-Wallis,  $P = 1.5 \cdot 10^{-6}$ , Dunn's post-hoc test with  $p = 3.7 \cdot 10^{-3}$ ; with similar  $\tau = 20.4 \pm 3.5$  ms). Also, the peak amplitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  currents was smaller in P15-P21 *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs as compared to P15-P21 WT-IHCs (Fig. 4C; one-way ANOVA,  $P = 1.3 \cdot 10^{-3}$ , Tukey's post-hoc test  $p = 5.3 \cdot 10^{-3}$ ). Remarkably, the expression of all the mini-*Otof* tested, even *Otof*-C2-ACDF which poorly rescue RRP exocytosis, restored the amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  currents in P15-P21 *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs to levels comparable to WT-IHCs (Fig. 4C, Table 2). However, only *Otof*-C2-DEF restored the fast inactivating component of the  $\text{Ca}^{2+}$  current in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (mean amplitude of  $19 \pm 3$  pA with  $\tau = 20.6 \pm 3.2$  ms) as compared to *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs ( $5 \pm 2$  pA with  $\tau = 20.4 \pm 3.5$  ms): when IHCs were stepped from -80 mV to -10 mV (Table 2 and Fig. 4D). These results are in good agreement with previous *in vitro* protein-protein interactions assays showing that otoferlin can interact through its C-terminal C2 domains, notably C2-DEF, with the  $\text{Ca}_v1.3$  channels (Ramakrishnan et al., 2008; Hams et al., 2017). Furthermore, they confirm that otoferlin is essential for the functional expression of the fast inactivating  $\text{Ca}_v1.3_S$  in IHCs (Vincent et al., 2017), likely through a functional interaction between C2-DEF and  $\text{Ca}_v1.3_S$ . Note that none of the combinations of the four C2 domain constructs C2-ACEF or C2-ACDF resulted in a significant recovery of the fast inactivating component of  $\text{Ca}^{2+}$  current (Fig. 4D). We recall that, in order to insert the four C2 domains of the mini-*Otof* into the AAV construct, we truncated some of the inter-C2 sequence between the domains C2A-C2C and C2E-C2F for ACEF (see Fig. 1A and Methods). A similar truncation was done for ACDF. It is therefore possible that these inter-C2 sequences are important for  $\text{Ca}^{2+}$  current inactivation while leaving intact the membrane expression level of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

### **Mini-*Otof* construct partially restore the number of synaptic ribbon in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs**

As previously described by Vincent et al. (2017), we found that IHCs from *Otof*<sup>-/-</sup> mice displayed a significant lower number of synaptic ribbons at P15-P17 as compared to WT IHCs (Fig. 5A, 5C):  $10.7 \pm 0.3$  ribbons per cell ( $n = 70$  *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs from 3 mice) and  $16.2 \pm 0.3$  ( $n = 40$  WT IHCs from 3 mice; one-way ANOVA,  $P < 10^{-4}$ ; Tukey's post-hoc test  $p < 10^{-4}$ ), respectively. This comparative quantification of the ribbon numbers was done in the same cochlear area where the patch-clamp recordings were performed (20-40% normalized distance from the cochlear apex corresponding to encoding frequencies between 8 to 16 kHz). Note that the mean number of ribbons per WT IHCs is consistent previous findings (Meyer et

al. 2009; Vincent et al. 2014). We found that the viral expression of *Otof*-C2-EF in P15-P17 *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs lead to a significant increase in the number of ribbons per IHC as compared to non-injected and sham *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs:  $11.9 \pm 0.4$  ribbons per IHCs (n = 43 IHCs from 3 mice; one-way ANOVA, p = 0.022; Fig. 5C). The number of synaptic ribbon per IHCs in control untreated *Otof*<sup>-/-</sup> mice continued to decrease to  $7.1 \pm 0.3$  ribbons (n = 56 IHCs) at P30-P32 as compared to P15-P17 (unpaired t-test p <  $10^{-4}$ ; Fig. 5C, 5D). Again, cochlear injection of C2-ACEF in *Otof*<sup>-/-</sup> mice led to a significant preservation of about two ribbons per IHCs at P30-P32 as compared to untreated control *Otof*<sup>-/-</sup> mice ( $8.8 \pm 0.2$ ; n = 31 IHCs; Kruskal-Wallis, P =  $6.7 \cdot 10^{-9}$ , Dunn's post-test p =  $1.8 \cdot 10^{-3}$ , Fig 5D). The incomplete preservation of the ribbons with C2-EF and C2-ACEF was in line with the partial restoration of the RRP responses (Fig 3A,3B).

Also, as previously described (Vincent et al., 2014; 2015; 2017), we found that the resting whole-cell membrane capacitance of IHCs from *Otof*<sup>-/-</sup> mice, measured at  $V_H = -70$  mV, was significantly reduced as compared to WT IHCs:  $8.8 \pm 0.09$  pF (n = 53) and  $10.79 \pm 0.14$  pF (n = 43; one-way ANOVA, P =  $2.9 \cdot 10^{-7}$ , Tukey's post-hoc test p =  $8.7 \cdot 10^{-7}$ ), respectively (Fig. 5E). This reduction in surface membrane area of IHCs lacking otoferlin can be explained by a reduced resting vesicular exocytosis and a sustained otoferlin-independent slow endocytosis (Vincent et al., 2014). The viral expression of all mini-*Otof* in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs, did not produced a significant change in the resting IHC membrane capacitance as compared to *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (one-way ANOVA; Tukey's post-hoc test p > 0.05; Fig. 5E).

### **Mini-*Otof* constructs reveal ultrafast endocytosis in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs**

*Dyngo-4a, by blocking endocytosis, increases exocytosis evoked by voltage activation of  $Ca^{2+}$  channels*

Dyngo-4a is a highly potent inhibitor of dynamin, a GTP binding protein essential for ultrafast endocytosis (Watanabe et al., 2013). Dynamin is thought to polymerize around the neck of the synaptic vesicles that are fused with the plasma membrane, leading to a fast membrane fission and pinching off of the vesicle from the plasma membrane active zone. Both dynamin 1 and 3 are expressed in IHCs (Neef et al., 2014; Shen et al., 2015). We first tested the effect of external application of 30  $\mu$ M Dyngo-4a on the mobilization of the RRP evoked by 5 consecutive brief 20 ms-depolarizing pulses, with inter-pulse interval of 100 ms, in P15-P21 WT IHCs (Fig. 6A). Remarkably, the dynamin inhibitor largely increased the

RRP responses (Fig. 6A, C). The increase in  $\Delta C_m$  responses was not the result of increased  $Ca^{2+}$  currents since similar amplitudes were found in presence or absence of the endocytotic inhibitor (Fig. 6D). If we consider that the  $\Delta C_m$  responses result from the net difference between exo- and endocytosis, the increasing effect of Dyngo-4a on the  $\Delta C_m$  response suggested that a 20 ms time scale endocytosis in IHCs was blocked, a time scale in the range of the ultrafast endocytosis described in central synapses (Watanabe et al., 2013b). Notably, application of Dyngo-4a had no effect on the  $\Delta C_m$  responses recorded in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs, suggesting that the small residual otoferlin-independent exocytosis was not large enough to trigger measurable ultrafast endocytosis (Fig. 6B, C). Alternatively, this result suggested that otoferlin is required for ultrafast endocytosis.

*Dyngo-4a increases the  $\Delta C_m$  responses triggered upon intracellular  $Ca^{2+}$  uncaging*

The effect of Dyngo-4a was also tested on  $\Delta C_m$  responses evoked during intracellular  $Ca^{2+}$  uncaging experiments (Fig. 7). In these conditions, in WT-IHCs, we observed a significant increase in the rate of the  $\Delta C_m$  responses, calculated as the first derivative at each point of the  $\Delta C_m$  response curve, in presence of Dyngo-4a responses (maximal  $dC_m/dt$  of  $42.8 \pm 2.2$  fF/ms and  $88.4 \pm 3.9$  fF/ms, respectively without and with Dyngo-4a, unpaired t-test  $p = 0.019$ ). Also the maximum amplitude was significantly larger in presence of Dyngo-4a (from  $1293 \pm 26$  fF to  $1813 \pm 57$  fF, unpaired t-test,  $p = 0.027$ , Fig 7A), again suggesting that ultrafast endocytosis occurs concomitantly to exocytosis. Subtracting the  $\Delta C_m$  responses produced by  $Ca^{2+}$  uncaging in presence of Dyngo-4a from those obtained in absence of Dyngo-4a indicated an ultrafast endocytosis with a time constant of  $\tau = 10.9 \pm 0.5$  ms, a maximal amplitude of  $737.1 \pm 24.9$  fF and a maximal rate ( $dC_m/dt$ ) of  $70.7$  fF/ms (Fig. 7B, Table 3). Of note, Dyngo-4a had no significant effect on the rate of  $\Delta C_m$  responses evoked by  $Ca^{2+}$  uncaging in non-injected *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (maximal rate of  $2.0 \pm 0.1$  fF/ms and  $2.2 \pm 0.1$  fF/ms, with and without Dyngo-4a respectively, unpaired t-test  $p = 0.74$ ), again indicating that the rate of exocytosis in absence of otoferlin is too slow to trigger ultrafast endocytosis and/or that otoferlin is required for endocytosis (Fig. 7C,D).

We then tested the effects of Dyngo-4a on  $Ca^{2+}$  uncaging-evoked exocytosis in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs expressing *Otof*-C2-EF. Remarkably, the presence of Dyngo-4a significantly increased the initial mean rate of exocytosis during the first 20 ms after the UV flash (from  $0.9 \pm 0.1$  fF/ms without Dyngo-4a and  $2.8 \pm 0.1$  fF/ms with Dyngo-4a, unpaired t-test  $p = 0.02$ ; Fig

7E). Subtracting the traces in presence of Dyngo-4a from those in absence again indicated a transient fast initial decrease in  $\Delta C_m$ , i.e. an ultrafast endocytosis with a maximal amplitude of  $44.7 \pm 4.3$  fF, a time constant of  $7.6 \pm 1.0$  ms and a maximal rate of 7.9 fF/ms (Fig. 7F, Table 3). Surprisingly, the endocytotic response was transient and followed by an increase in membrane capacitance (Fig.7F). This was likely due to the fact that in presence of Dyngo-4a the exocytotic response depressed more rapidly with time than the untreated control *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (Fig 7E). This suggested that vesicle endocytosis could participate in local fast recycling of synaptic vesicles and this process contributes to sustain release.

It is unlikely that the IHC capacitance responses measured during  $Ca^{2+}$  uncaging results or is contaminated by thermal excitation of the mechanoelectrical transduction apparatus and depolarization (Azimzadeh et al., 2018). In this later study, the power density of the UV laser used to generate thermal effect in hair cells is extremely high, more three order of magnitude larger than our UV power density generated with our UV-LED. Our UV-LED flash produced no significant thermal effect to stimulate the hair cells. Strong arguments for this assumption come from the absence of sustained repetitive  $C_m$  responses once intracellular DM-nitrophen is photolyzed, when applying repetitive consecutive UV-flash, or the absence of  $C_m$  response when flashing with UV the IHCs in absence of intracellular DM-nitrophen (unpublished data). Furthermore, recordings in whole-cell voltage-clamp conditions should minimize UV-induced membrane depolarization in our study.

Why endocytosis, unmasked by Dyngo-4A, was first transiently observed during  $Ca^{2+}$  uncaging in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs *Otof*-C2-EF? One possible explanation is that endocytosis, a  $Ca^{2+}$ -dependent process (Yamashita et al., 2010), is more  $Ca^{2+}$  sensitive as compared to exocytosis but it is inhibited at high  $Ca^{2+}$  concentration at which exocytosis is still activated, as previously proposed at synaptic terminals of bipolar neurons by von Gersdorff and Matthews (1994a and 1994b). It is worth noting that our UV-LED- $Ca^{2+}$  uncaging system was measured to rise the concentration of intracellular  $Ca^{2+}$  in IHCs to 20  $\mu$ M within 15-20 ms (Michalski et al., 2017).

The amplitude of endocytosis, revealed by  $Ca^{2+}$  uncaging and the effect of Dyngo-4a, was much smaller in *Otof*<sup>-/-</sup> IHC expressing the mini-*Otof* constructs C2-EF as compared to WT IHCs. However, the endocytotic time constant was similarly ultrafast, respectively 7.6 and 10.9 ms, suggesting that this Dyngo-4a sensitive process was similar. The difference in rate and amplitude could be explained by the fact that the mini-otoferlin C2-EF incompletely

restores the rate of vesicle fusion and/or more importantly the vesicle replenishment as indicated in Fig. 3.

*Mini-Otof constructs reveal ultrafast endocytosis during intracellular Ca<sup>2+</sup> uncaging*

When compared to a new set of non-injected *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs, uncaging intracellular Ca<sup>2+</sup> in P15-P21 IHCs from mouse injected with AAV8-C2-DEF displayed an initial decrease in the rate of the  $\Delta C_m$  responses from  $1.83 \pm 0.01$  fF/ms to  $1.10 \pm 0.01$  fF/ms (unpaired t-test,  $p = 0.036$ , Fig. 8A). The subtraction of the traces gave a mean ultrafast endocytosis amplitude of  $35.8 \pm 4.6$  fF, a time constant of  $16.0 \pm 4.7$  ms and maximal rate  $dC_m/dt$  of 7.0 fF/ms (Fig. 8B; Table 3). Similar ultrafast endocytosis was obtained with *Otof*-C2-EF (Fig 8C-D and Table 3) and *Otof*-C2-ACDF (curve not shown; Table 3). The initial rate of endocytosis produced by *Otof*-C2-DEF, *Otof*-C2-EF and *Otof*-C2-ACDF may have been underestimated because the change in membrane capacitance upon Ca<sup>2+</sup> uncaging likely results at each point of the curve from the balance of exocytosis and endocytosis and we cannot rule out that these two events occur concomitantly. Remarkably, the initial endocytosis was rapidly followed by exocytosis in IHCs from *Otof*-C2-DEF and *Otof*-C2-EF injected mice but not in *Otof*-C2-ACDF (not shown), in agreement with their respective efficiency in restoring exocytosis when voltage-stepping the cells (Fig. 3A-C). During the voltage-activation of Ca<sup>2+</sup> currents in Fig 3A-C, it is likely that we missed the initial transient ultrafast endocytosis because of the recording blind window inherent to the single sine-wave  $C_m$  measurement technique during the Ca<sup>2+</sup> current activation.

Uncaging intracellular Ca<sup>2+</sup> in IHCs from mouse injected with AAV8-C2-ACEF showed an initial increase of the exocytotic response from  $2.31 \pm 0.03$  fF/ms to  $3.90 \pm 0.14$  fF/ms (Fig. 8E; unpaired t-test,  $p = 0.022$ ). Subtracting the  $\Delta C_m$  responses of *Otof*-C2-ACEF-injected IHCs from non-injected *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (new set of *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs recorded simultaneously to *Otof*-C2-ACEF-injected IHCs) indicated first a transient exocytosis with mean amplitude of  $57.3 \pm 6.4$  fF, a time constant of  $5.2 \pm 2.5$  ms and maximal rate  $dC_m/dt$  of 6.9 fF/ms (Fig. 8F; Table 3). This initial exocytotic response was transient and followed by a fast  $C_m$  decrease likely reflecting ultrafast endocytosis with a mean amplitude of  $65.7 \pm 4.1$  fF, a time constant of  $87.2 \pm 12.9$  ms and maximal rate  $dC_m/dt$  of 0.8 fF/ms. Why Ca<sup>2+</sup> uncaging in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs expressing *Otof*-C2-ACEF first produced a transient fast exocytosis? This is possibly due to the higher efficiency of *Otof*-C2-ACEF to restore RRP exocytosis as compared to

*Otof-C2-EF* or *C2-DEF* (see Fig. 3). Then, endocytosis in *Otof-C2-ACEF* IHCs was only revealed secondary to exocytosis when the vesicular RRP pool was exhausted because of the absence of an efficient vesicle replenishment. Alternatively *Otof-C2-ACEF*, while being highly  $\text{Ca}^{2+}$  efficient for exocytosis could be much less effective for endocytosis as indicated by its lower rate and time constant as compared to *Otof-C2-EF*.

## DISCUSSION

### *Restoration of RRP exocytosis with mini-otoferlins*

We showed that expression of the mini-otoferlins *Otof-C2-EF*, *-C2-DEF* and *-C2-ACEF*, can partially restore RRP exocytosis in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs. *Otof-C2-ACEF* was the most efficient, with restoration of exocytosis to levels similar to WT mice for stimulations less than 15 ms (Fig. 3B). *C2-EF* and *C2-DEF* constructs also restored exocytosis but only partially, up to 40 % of the WT level. Interestingly, *Otof-C2-ACDF* was the less efficient mini-*Otof* and therefore revealed the importance of C2-E domain, or its association with C2-F domain at the C-terminal region of otoferlin. The C2-E domain has been shown to potentially bind to the t-SNARE protein syntaxin 1A *in vitro* (Ramakrishnan et al., 2009), a protein that is expressed in IHCs (Safieddine and Wenthold, 1999) and is generally implicated in the docking of synaptic vesicles with the presynaptic plasma membrane. The importance of the C2-F domain of otoferlin has been emphasized in the *pachanga* mouse model bearing a substitution point mutation in this domain (Pangrsic et al., 2010). In *pachanga* mice, IHCs have normal initial vesicle fusion of docked-primed vesicle but a strong defect in vesicle recruitment at the active zone. The C2-F domain can interact *in vitro* with both t-SNARE proteins (syntaxin-1A and SNAP-25) and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) at the plasma membrane (Roux et al., 2006; Ramakrishnan et al., 2009; Padmanarayana et al., 2014, Fig. 9), similarly to the C2-B domain of synaptotagmin (Wang et al., 2016). We propose that the tandem the C2-EF domain of otoferlin is at least necessary for vesicle fusion at the active zone of IHCs, presumably by interacting with the vesicle-attached t-SNAREs protein and the plasma membrane. Notably, truncated forms of otoferlin retaining the C-terminal C2-F domain were also shown to rescue the otoferlin knock out phenotype in zebrafish (Chatterjee et al., 2015).

Interestingly, the C2-EF domain of another Ferlin-like C2-domain protein, dysferlin, is considered essential for Ca<sup>2+</sup>-triggered vesicle-plasma membrane fusion in skeletal and cardiomyocytes (Lek et al., 2012). A "mini-dysferlin", constituted by C2-EF domains and the C-terminal transmembrane domain, can be produced by intracellular calpain-1 digestion. This release of C2-EF was found to recruit vesicles to the sites of membrane injury faster than the long native form (Lek et al., 2013). A calpain-1 cleavage was also found in otoferlin, forming a possible "mini-otoferlin" with C2-EF and TM domain (Redpath et al., 2014). Previous studies hypothesized that C-terminal dual-C2 domains (synaptotagmin-like modules) released through enzymatic cleavage of ferlin proteins have specialized vesicle-fusion modality



(Redpath et al., 2014). However, our observation that the tandem C2-EF domain of otoferlin only poorly restored RRP-exocytosis suggests that this mini-otoferlin does not have a crucial function in IHCs.

Remarkably, addition of C2-A and C2-C domains to the *Otof*-C2-EF construct lead to a more efficient recovery of RRP exocytosis in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs. These C2 domains can also potentially interact with syntaxin 1A, SNAP-25, PIP2 and the L-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> Ca<sub>v</sub>1.3 channels (Ramakrishnan et al., 2009; Padmanarayana et al., 2014). Addition of C2-A and C2-C to C2-EF could therefore allow increased synaptic protein interactions such as a multiple binding to SNARE proteins simultaneously (Hams et al., 2017). Furthermore, C2-A and C2-C domains associated to C2-EF, forming a longer construct, could also facilitate protein folding and self C2-C2 interactions (Fig. 9). Indeed, the *Otof*-C2-ACEF could more easily form a folding tertiary structure "closed" at low Ca<sup>2+</sup> concentrations that could "open" as Ca<sup>2+</sup> increases to promote vesicle fusion, this model being proposed for the native otoferlin by Ramakrishnan et al. (2014). Note that open and closed states of C2A-C2B domains have also been proposed for synaptotagmins (Fuson et al., 2007; Evans et al., 2016). We propose that the C2-ACEF domains of otoferlin are necessary and sufficient to promote efficient Ca<sup>2+</sup>-evoked vesicle fusion in IHCs.

Surprisingly, the *Otof*-C2-ACEF construct failed to restore hearing in mice lacking otoferlin, although partially rescuing RRP exocytosis. The lack of hearing restoration could be easily explained at the IHC level by the absence of efficient vesicle recruitment to the RRP vesicle component, as similar defects were also found in *pachanga* mice (Pangrsic et al., 2010). Our study confirms that the full length of otoferlin is required for efficient Ca<sup>2+</sup>-dependent recruitment of the synaptic vesicle to the active zone. Full-length otoferlin, by promoting additional C2-C2 interactions, could promote the formation of long tethers holding and priming the synaptic vesicles at the IHC active zones, a crucial structure for vesicle replenishment (Vogl et al., 2016).

Another unexpected result was that the C2-DEF mini-otoferlin did not produce a better exocytosis restoration as compared to C2-EF. Notably, this C2-DEF construct, although lacking the FerA domain, closely corresponds to the short cDNA isoform found in humans but not in mice (Yasunaga et al., 2000). Therefore, our study suggests either that short human-like short otoferlin isoform does not function as an efficient Ca<sup>2+</sup> sensor for exocytosis in mouse IHCs or that the FerA domain, a four helix bundle that can binds to lipids in a Ca<sup>2+</sup>

dependent manner (Harsini et al., 2018), missing in our C2-DEF construct, is essential for an efficient fast vesicular fusion.

#### *Otoferlin and Ca<sup>2+</sup> channel interaction*

At the IHC active zone, the Ca<sub>v</sub>1.3 L-type Ca<sup>2+</sup> channels, governing Ca<sup>2+</sup>-triggered synaptic exocytosis in IHCs, are thought to be expressed as long and short C-terminal isoforms (Scharinger et al., 2015, Vincent et al., 2017). The short isoforms (Ca<sub>v</sub>1.3<sub>S</sub>), with fast inactivation, are essential to drive the RRP exocytosis in IHCs while the long isoforms (Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub>) with slow inactivation regulate vesicle recruitment (Vincent et al., 2017). Notably, Ca<sub>v</sub>1.3<sub>S</sub>, but not the long Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub>, associate in functional cooperative clusters of two or more channels, to facilitate Ca<sup>2+</sup> currents in hippocampal neurons (Moreno et al., 2016). Similarly, Ca<sub>v</sub>1.3<sub>S</sub> could aggregate in cooperative clusters to potentiate Ca<sup>2+</sup> influx at the active zone of IHCs.

The absence of otoferlin in IHCs is associated with a lack of the fast inactivating component of the Ca<sup>2+</sup> currents and a decreased expression of Ca<sub>v</sub>1.3<sub>S</sub> (Vincent et al., 2017), suggesting a functional interaction between otoferlin and Ca<sub>v</sub>1.3<sub>S</sub> channels at the IHC synapses. Direct interactions between the II-III cytoplasmic loop of Ca<sub>v</sub>1.3 and otoferlin, via the C2-D or C2-ABDF domains of otoferlin have been suggested (Ramakrishnan et al., 2009; Hams et al., 2017). Thus, the restoration of the fast inactivating component of the Ca<sup>2+</sup> currents in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs with *Otof* C2-EF, improved with the addition of the C2-D domain (*Otof*-C2-DEF construct) is in agreement with the literature and confirms that the C-terminal C2 domains of otoferlin interact with Ca<sub>v</sub>1.3<sub>S</sub> channels. Surprisingly, the *Otof*-C2-ACEF construct did not produce a significant recovery of the fast inactivating component of I<sub>Ca</sub>. Notably this construct, contains a small deletion revealed by 3D-structural modeling between the C2-E and C2-F (1695aa△1731aa), which could alter the interaction with Ca<sub>v</sub>1.3 channels.

#### *Otoferlin and ultrafast endocytosis*

A striking finding of our study was the expression of ultrafast endocytosis in auditory IHCs. Although different slow modes of endocytosis, likely clathrin-dependent, have been described in IHCs (Beutner et al., 2001; Cho et al., 2011; Neef et al. 2014; Jung et al., 2015), they remain too slow to support the unusually high rate of exocytosis in auditory IHCs. Previous studies have revealed the existence of ultrafast endocytosis with a time constant of 50 ms in mouse hippocampal synapses (Watanabe et al., 2013b, 2014). The molecular mechanisms

underlying ultrafast endocytosis are not fully understood but its dependence on dynamin to pinch-off the endocytic vesicle is well recognized. Consistent with these previous studies, we here report a novel dynamin-dependent ultrafast endocytosis in IHCs that can compensate exocytosis at a 20 ms time scale. This time scale is too fast for the dynamin-dependent clathrin-mediated-endocytosis known to occur in IHCs at time scales ranging from 300 ms to 30 s, and we found that ultrafast endocytosis was absent in IHCs lacking otoferlin. We propose that otoferlin functions as a dual  $\text{Ca}^{2+}$  sensor for exocytosis and endocytosis, much like synaptotagmin I (Poskanzer et al, 2003; Yao et al., 2011).

Ultrafast endocytosis in neuronal synapses is sensitive to latrunculin-A, a sponge toxin that disrupt the F-actin filaments at synaptic active zones (Watanabe et al., 2013). The F-actin cytoskeleton is thought to be essential for the polymerization and constriction of dynamin molecules around vesicle necks before fission and scission. Interestingly, latrunculin-A has also been previously shown to disrupt F-actin at the IHC ribbon active zones and increase the rate of exocytosis (Vincent et al., 2015; Guillet et al., 2016). We believe that increased exocytotic rates produced by latrunculin-A could also be, at least in part, due to inhibition of ultrafast endocytosis, resulting in a positive effect on exocytosis similar to that observed with Dyngo-4a.

### *Conclusions*

Our study shows the importance of the C-terminal C2 domains of otoferlin in triggering RRP exocytosis and regulating ultrafast endocytosis in IHCs. However, these mini-otoferlins did not restore vesicle replenishment at the IHC active zones, this process possibly requires cooperative intramolecular interactions between C2 domains of otoferlin, in a way similar to the tandem C2 domains of synaptotagmin-1 (Evans et al., 2016).

## REFERENCES

- Akil O, Rouse SL, Chan DK, Lustig LR (2015) Surgical method for virally mediated gene delivery to the mouse inner ear through the round window membrane. *J Vis Exp*. doi: 10.3791/52187.
- Azimzadeh JB, Fabella BA, Kastan NR, Hudspeth AJ. (2018) Thermal Excitation of the Mechanotransduction Apparatus of Hair Cells. *Neuron*. Feb 7;97(3):586-595..
- 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*. 30:13281-90.
- Beutner D, Voets T, Neher E, Moser T (2001) Calcium dependence of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse. *Neuron*. 29:681-90.
- 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*. Dec 9;286(49):42736-48.
- 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*. 31:5682-92.
- Chapman ER (2008) How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annu Rev Biochem*. 77:615-41
- 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*. 35:1043-54.

Delvendahl I, Vyleta NP, von Gersdorff H, Hallermann S (2016) Fast, Temperature-Sensitive and Clathrin-Independent Endocytosis at Central Synapses. *Neuron*. 90:492-8.

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*. 29:10474-87.

Dulon D, Papal S, Patni P, Cortese M, Vincent PF, Tertrais M, Emptoz A, Tlili A, Bouleau Y, Michel V, Delmaghani S, Aghaie A, Pepermans E, Alegria-Prevot O, Akil O, Lustig L, Avan P, Safieddine S, Petit C, El-Amraoui A. (2018) Clarin-1 gene transfer rescues auditory synaptopathy in model of Usher syndrome. *J Clin Invest*. 128:3382-3401

Duncker SV, Franz C, Kuhn S, Schulte U, Campanelli D, Brandt N, Hirt B, Fakler B, Blin N, Ruth P, Engel J, Marcotti W, Zimmermann U, Knipper M (2013) Otoferlin couples to clathrin-mediated endocytosis in mature cochlear inner hair cells. *J Neurosci*. 33:9508-19.

Emptoz A, Michel V, Lelli A, Akil O, Boutet de Monvel J, Lahlou G, Meyer A, Dupont T, Nouaille S, Ey E, Franca de Barros F, Beraneck M, Dulon D, Hardelin JP, Lustig L, Avan P, Petit C, Safieddine S (2017) Local gene therapy durably restores vestibular function in a mouse model of Usher syndrome type 1G. *Proc Natl Acad Sci USA*. 114:9695-9700.

Evans CS, He Z, Bai H, Lou X, Jeggle P, Sutton RB, Edwardson JM, Chapman ER (2016) Functional analysis of the interface between the tandem C2 domains of synaptotagmin-1. *Mol Biol Cell*. 27:979-89.

Fuson KL, Montes M, Robert JJ, Sutton RB (2007) Structure of human synaptotagmin 1 C2AB in the absence of Ca<sup>2+</sup> reveals a novel domain association. *Biochemistry*. 46(45):13041-8.

Guillet M, Sendin G, Bourien J, Puel JL, Nouvian R (2016) Actin Filaments Regulate Exocytosis at the Hair Cell Ribbon Synapse. *J Neurosci*. 36(3):649-54

Hams N, Padmanarayana M, Qiu W, Johnson CP (2017) Otoferlin is a multivalent calcium-sensitive scaffold linking SNAREs and calcium channels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 114:8023-8028.

Han W, Rhee JS, Maximov A, Lin W, Hammer RE, Rosenmund C, Südhof TC (2005). C-terminal ECFP fusion impairs synaptotagmin 1 function: crowding out synaptotagmin 1. *J Biol Chem*. 280(6):5089-100.

Harsini FM, Chebrolu S, Fuson KL, White MA, Rice AM, Sutton RB. (2018) FerA is a Membrane-Associating Four-Helix Bundle Domain in the Ferlin Family of Membrane-Fusion Proteins. *Sci Rep*. Jul 19;8(1):10949.

Jung S, Maritzen T, Wichmann C, Jing Z, Neef A, Revelo NH, Al-Moyed H, Meese S, Wojcik SM, Panou I, Bulut H, Schu P, Ficner R, Reisinger E, Rizzoli SO, Neef J, Strenzke N, Haucke V, Moser T (2015) Disruption of adaptor protein 2 $\mu$  (AP-2 $\mu$ ) in cochlear hair cells impairs vesicle reloading of synaptic release sites and hearing. *EMBO J*. 34:2686-702.

Kiang N (1965) *Discharge Patterns of Single Fibers in the Cats Auditory Nerve*, by Nelson Yuan-Sheng Kiang, Research Monograph No. 35, published by the MIT Press.

Lek A, Evesson FJ, Sutton RB, North KN, Cooper ST (2012) Ferlins: regulators of vesicle fusion for auditory neurotransmission, receptor trafficking and membrane repair traffic. *J Neurosci*. 33:185-94.

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*. 33:5085-94.

Liberman MC (2017). Noise-induced and age-related hearing loss: new perspectives and potential therapies. *F1000Res*. 2017 Jun 16;6:927. doi: 10.12688/f1000research.11310.1.

Lindau M, Neher E (1988) Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflugers Arch.* 411(2):137-46.

Llanga T, Nagy N, Conatser L, Dial C, Sutton RB, Hirsch ML (2017) Structure-Based Designed Nano-Dysferlin Significantly Improves Dysferlinopathy in BLA/J Mice. *Mol Ther.* 25:2150-2162.

Meyer AC, Frank T, Khimich D, Hoch G, Riedel D, Chapochnikov NM, Yarin YM, Harke B, Hell SW, Egner A, Moser T (2009) Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. *Nat Neurosci.* 4:444-53.

Michalski N, Goutman JD, Auclair SM, Boutet de Monvel J, Tertrais M, Emptoz A, Parrin A, Nouaille S, Guillon M, Sachse M, Ciric D, Bahloul A, Hardelin JP, Sutton RB, Avan P, Krishnakumar SS, Rothman JE, Dulon D, Safieddine S, Petit C (2017) Otoferlin acts as a Ca<sup>2+</sup> sensor for vesicle fusion and vesicle pool replenishment at auditory hair cell ribbon synapses. *eLife*; 6:e31013

Moreno CM, Dixon RE, Tajada S, Yuan C, Opitz-Araya X, Binder MD, Santana LF (2016) Ca<sup>2+</sup> entry into neurons is facilitated by cooperative gating of clustered Cav1.3 channels. *eLife.* 5.e15744.

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

Moser T, Neef A, Khimich D. (2006) Mechanisms underlying the temporal precision of sound coding at the inner hair cell ribbon synapse. *J Physiol.* 576:55-62.

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.* Jan 15;34(3):705-16.

Padmanarayana M, Hams N, Speight LC, Petersson EJ, Mehl RA, Johnson CP (2014) Characterization of the lipid binding properties of Otoferlin reveals specific interactions between PI(4,5)P<sub>2</sub> and the C2C and C2F domains. *Biochemistry*. 53:5023-33.

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.

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*. 13:869-76

Poskanzer KE, Marek KW, Sweeney ST, Davis GW (2003) Synaptotagmin I is necessary for compensatory synaptic vesicle endocytosis in vivo. *Nature* 426:559-63.

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*. 284:1364-72.

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(13):8750-66.

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*. 25:3037-48.

Revelo NH, Kamin D, Truckenbrodt S, Wong AB, Reuter-Jessen K, Reisinger E, Moser T, Rizzoli SO (2014) A new probe for super-resolution imaging of membranes elucidates trafficking pathways. *J Cell Biol*. 205:591-606.

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* 127:277-89.

Safieddine S, Wenthold RJ. (1999) SNARE complex at the ribbon synapses of cochlear hair cells: analysis of synaptic vesicle- and synaptic membrane-associated proteins. *Eur J Neurosci.* Mar;11(3):803-12

Scharinger A, Eckrich S, Vandael DH, Schönig 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<sup>2+</sup>-channels by a C-terminal automodulatory domain. *Front Cell Neurosci.* 9:309.

Selvakumar D, Drescher MJ, Deckard NA, Ramakrishnan NA, Morley BJ, Drescher DG (2017) Dopamine D1A directly interacts with otoferlin synaptic pathway proteins: Ca<sup>2+</sup> and phosphorylation underlie an NSF-to-AP2mu1 molecular switch. *Biochem J.* 474:79-104.

Shen J, Scheffer DI, Kwan KY, Corey DP (2015) SHIELD: an integrative gene expression database for inner ear research. *Database* (Oxford).

Südhof TC (2012) Calcium Control of Neurotransmitter Release. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4:a011353.

Taberner AM, Liberman MC (2005) Response properties of single auditory nerve fibers in the mouse. *J Neurophysiology.* 93:557-69

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.* 34:10853-69.

Vincent PF, Bouleau Y, Petit C, Dulon D. (2015) A Synaptic F-actin network controls otoferlin-dependent exocytosis in auditory inner hair cells *eLife.* 4:e10988.

Vincent PF, Bouleau Y, Charpentier G, Emptoz A, Safieddine S, Petit C, Dulon D (2017) Different Ca<sub>v</sub>1.3 Channel Isoforms Control Distinct Components of the Synaptic Vesicle Cycle in Auditory Inner Hair Cells. *J Neurosci.* 37:2960-2975.

Vogl C, Panou I, Yamanbaeva G, Wichmann C, Mangosing SJ, Vilardi F, Indzhukulian AA, Pangršič T, Santarelli R, Rodriguez-Ballesteros M, Weber T, Jung S, Cardenas E, Wu X, Wojcik SM, Kwan KY, Del Castillo I, Schwappach B, Strenzke N, Corey DP, Lin SY, Moser T. (2016) Tryptophan-rich basic protein (WRB) mediates insertion of the tail-anchored protein otoferlin and is required for hair cell exocytosis and hearing. *EMBO J.* 1;35(23):2536-2552.

von Gersdorff H, Matthews G (1994a) Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals. *Nature.*367:735-9

von Gersdorff H, Matthews G (1994b) Inhibition of endocytosis by elevated internal calcium in a synaptic terminal. *Nature.* 370:652-5.

Wang S, Li Y, Ma C. (2016) Synaptotagmin-1 C2B domain interacts simultaneously with SNAREs and membranes to promote membrane fusion. *Elife.* Apr 15;5. pii: e14211. doi:10.7554/eLife.14211.

Watanabe S, Liu Q, Davis MW, Hollopeter G, Thomas N, Jorgensen NB, Jorgensen EM (2013a) Ultrafast endocytosis at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junctions. *Elife.* 2:e00723.

Watanabe S, Rost BR, Camacho-Pérez M, Davis MW, Söhl-Kielczynski B, Rosenmund C, Jorgensen EM (2013b) Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature.* 504:242-247.

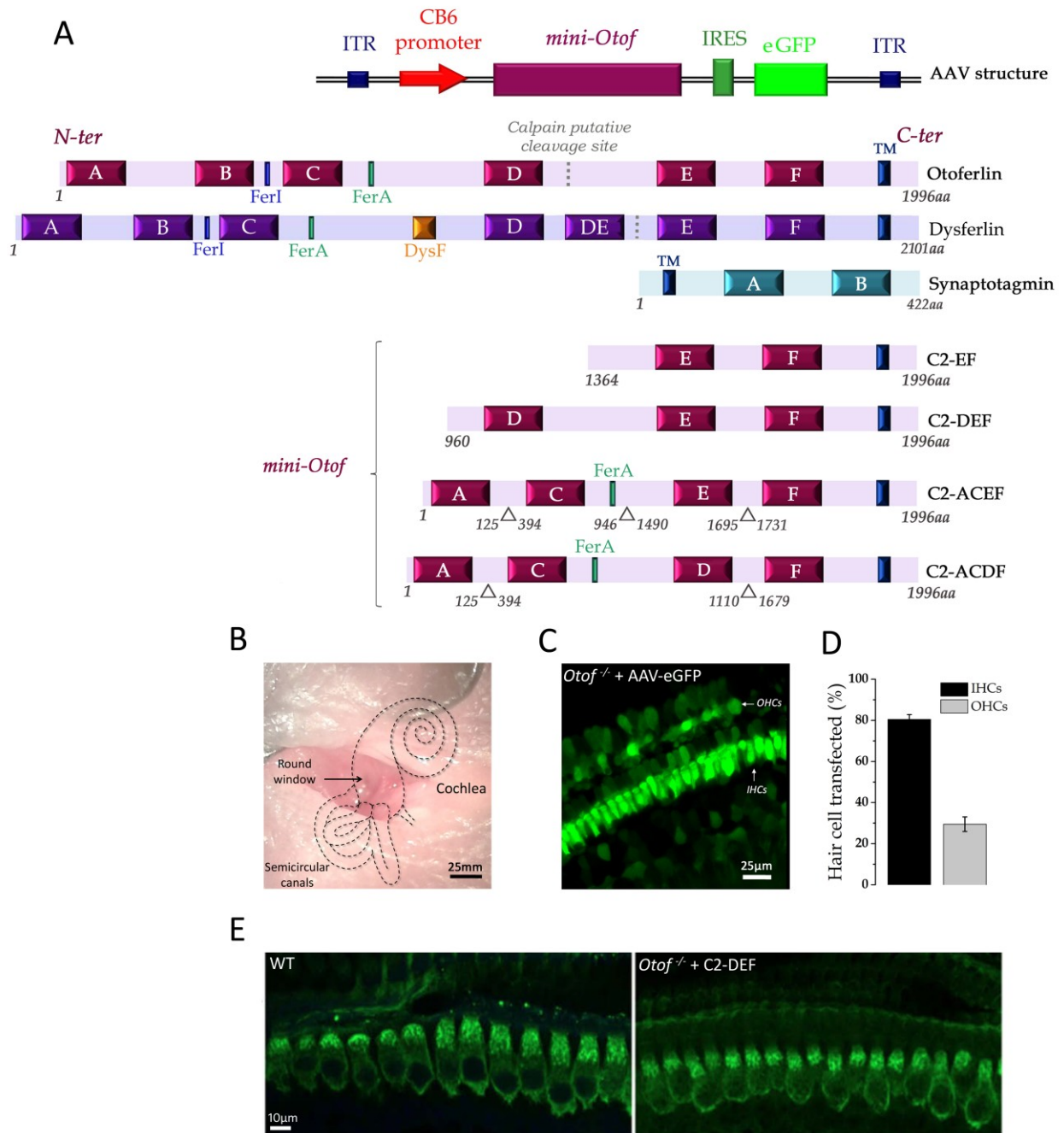
Watanabe S, Trimbuch T, Camacho-Pérez M, Rost BR, Brokowski B, Söhl-Kielczynski B, Felies A, Davis MW, Rosenmund C, Jorgensen EM (2014) Clathrin regenerates synaptic vesicles from endosomes. *Nature.* 515:228-33.

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.* 21:363-9.

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(3):591-600.

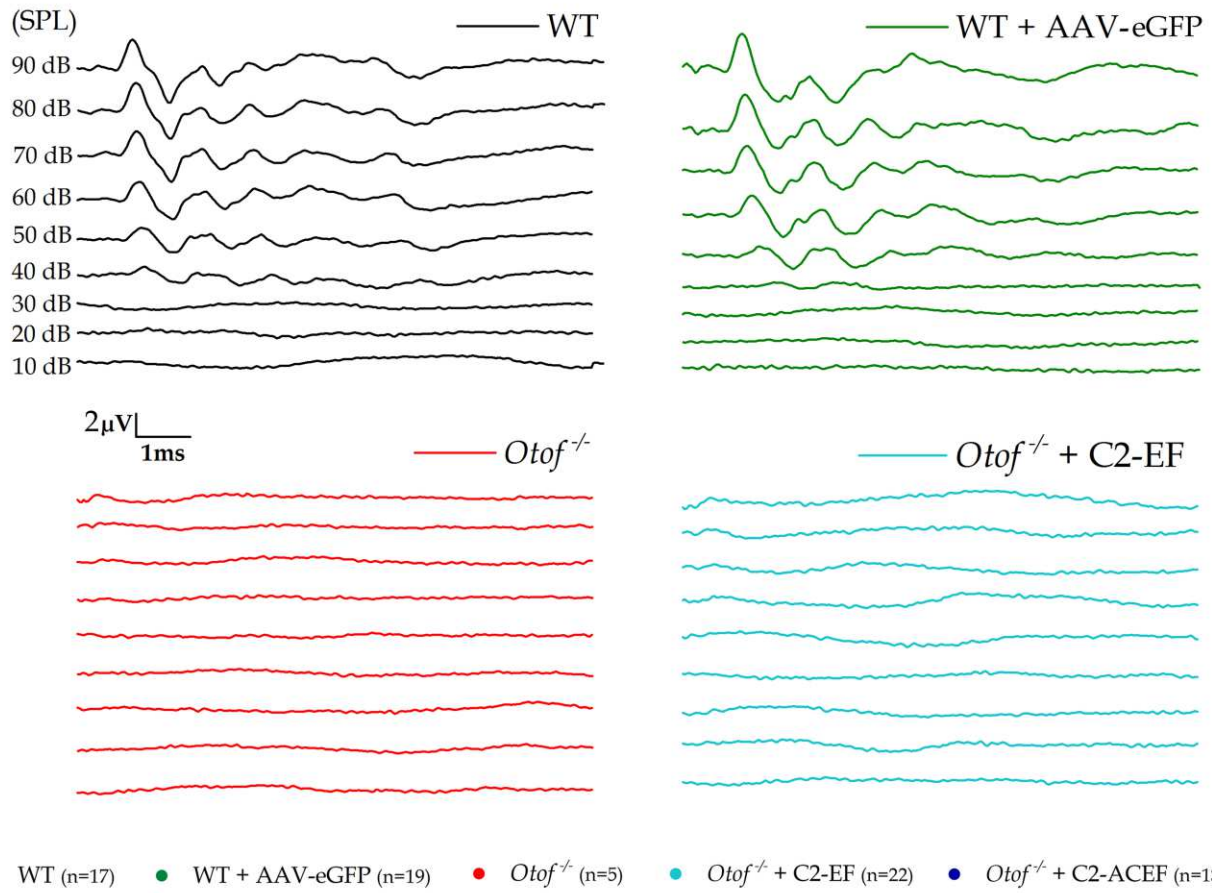
Yao J, Kwon SE, Gaffaney JD, Dunning FM, Chapman ER (2011) Uncoupling the roles of synaptotagmin I during endo- and exocytosis of synaptic vesicles. *Nat Neurosci.* 15:243-9.

FIGURES

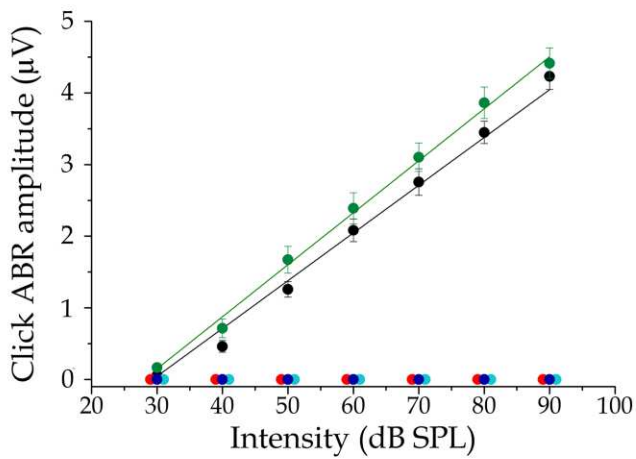


**Figure 1: Comparative structure of the native otoferlin and the four different mini-otoferlins inserted in the AAV vector to evaluate their role in hearing and IHC exocytosis.** (A) Otoferlin is a large protein (~2000 amino acids) that contains a single transmembrane domain (TM) at its C-terminal part, a FerA domain and six C2 domains (C2-A to C2-F) that potentially bind calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) and interact with phospholipids. Dysferlin, a dystrophy-associated Fer-1-like protein, contains seven C2 domains, a FerA domain and a DysF domain. The dotted lines in the otoferlin and dysferlin sequences indicate a putative calpain cleavage site (Lek et al., 2012; Redpath et al., 2014). Synaptotagmins, the major  $\text{Ca}^{2+}$  sensors in CNS synapses, which are absent in IHCs synapses (Beurg et al., 2010), only contain two C2 domains. Note that in humans, a short isoform of otoferlin with three C2-domains (C2-DEF) and a FerA domain with unknown function has been identified (Yasunaga et al., 1999). The putative function of these truncated mini-otoferlins C2-EF and C2-DEF in IHC exocytosis remains unknown. Also, two abridged otoferlin-like containing C2-ACEF or C2-ACDF construct (~30% smaller than the native otoferlin) were tested. The AAV8 sequence contains a promoter CB6 that allows the expression of the short otoferlins (C2-EF; C2-DEF; C2-ACEF or C2-ACDF domains) and the eGFP reporter (only for C2-EF) in IHCs. (B) AAVs are injected *in vivo* through the round window of the cochlea at postnatal day P1-P3. (C) For C2-EF, the successful AAV infection of IHCs was verified with the fluorescent reporter eGFP. (D) Rate of transfection for IHCs and OHC, respectively. (E) The expression of the mini-otoferlin C2-DEF in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs was verified by immuno-confocal imaging with a C-terminal otoferlin antibody. Note that the expression of C2-DEF was similar to the native otoferlin in WT IHCs.

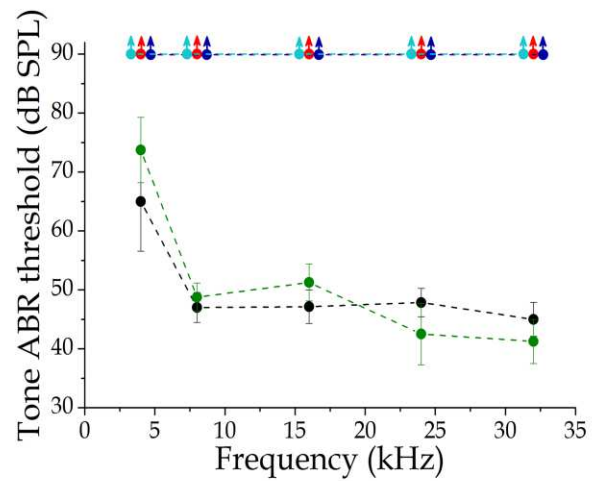
**A**



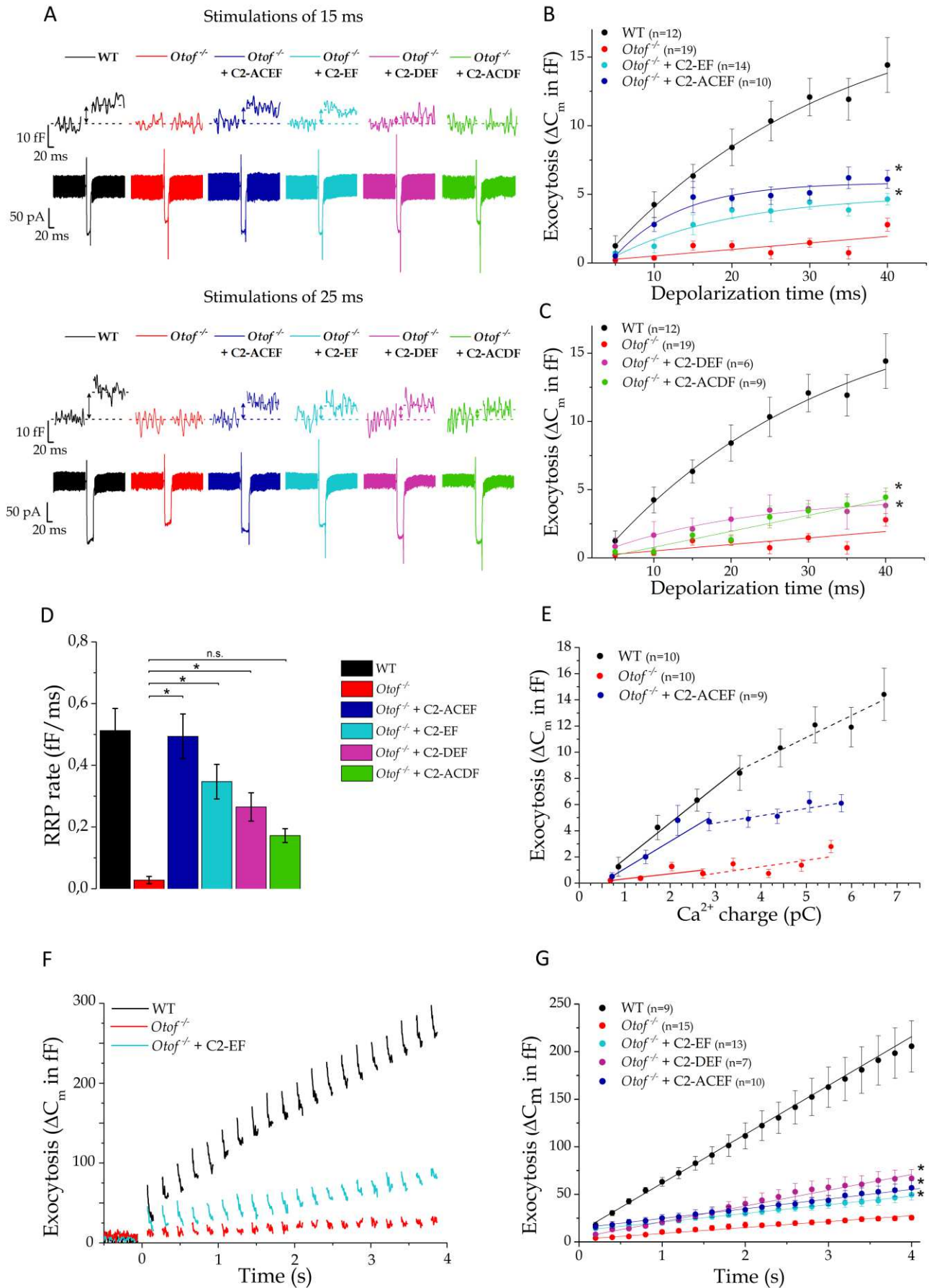
**B**



**C**

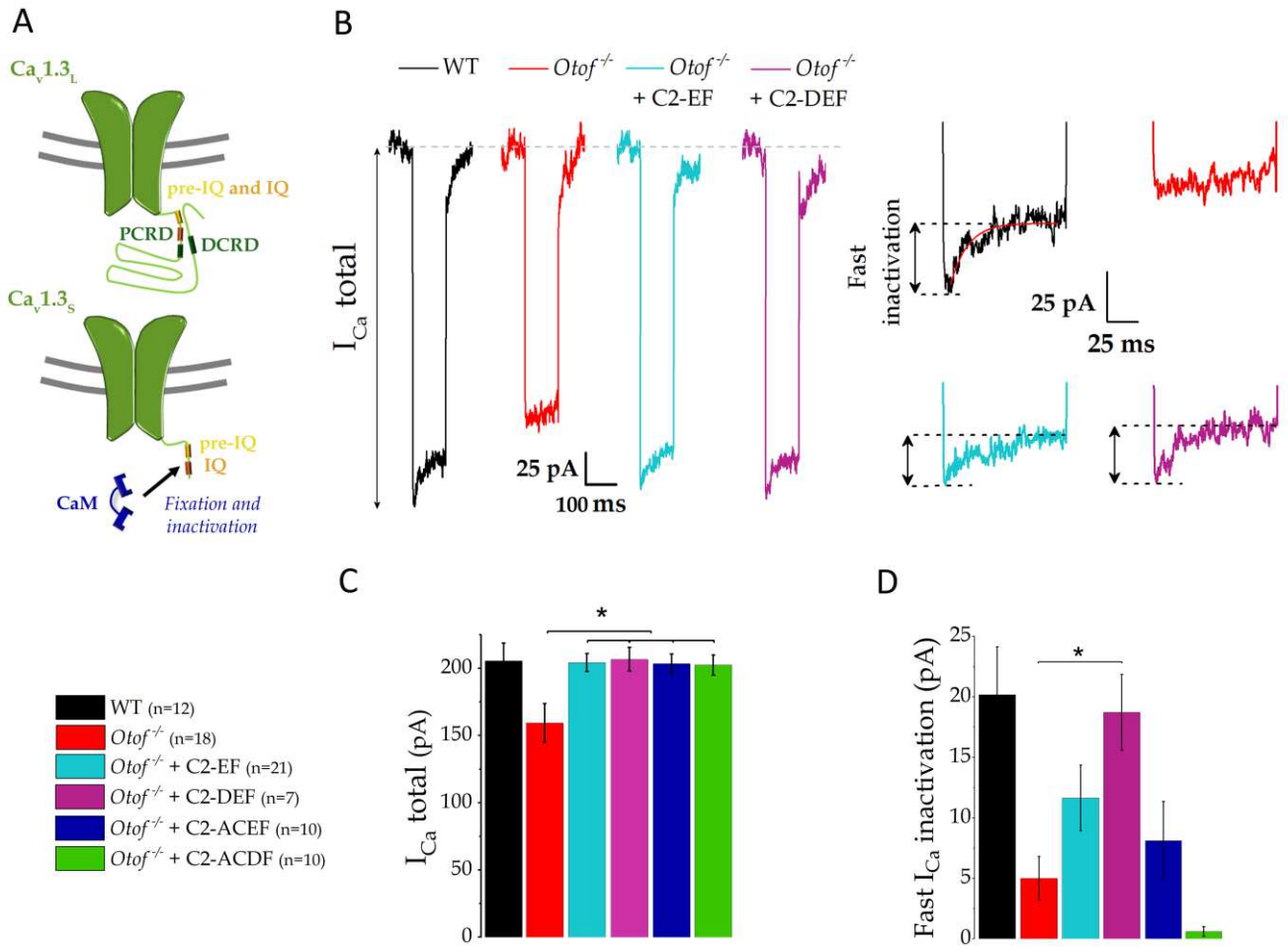


**Figure 2: Viral transfer of mini-otoferlins to IHCs failed to restore Auditory Brainstem Responses (ABRs) in *Otof*<sup>-/-</sup> mice.** The auditory function was tested two and three weeks (P15-P21) after the viral injection. **(A)** Example of click-ABR waves at different sound intensities (10 – 90 dB SPL) in WT (black trace) and WT mice injected with AAV8-eGFP (sham-injected, green trace). Note the absence of ABR waves in both non-injected *Otof*<sup>-/-</sup> mice (red trace) and AAV8-C2EF-IRES-eGFP injected mice (light blue trace). **(B)** Mean ABR wave I amplitude as a function of sound intensities and **(C)** tone ABR thresholds at sound frequency from 4 to 32 kHz, also indicated the absence of ABR waves in injected *Otof*<sup>-/-</sup> mice with Otof-C2-EF (light blue) or Otof-C2-ACEF (dark blue). Note that similar results were obtained with the other mini-otoferlins C2-DEF or C2-ACDF (not shown for clarity).

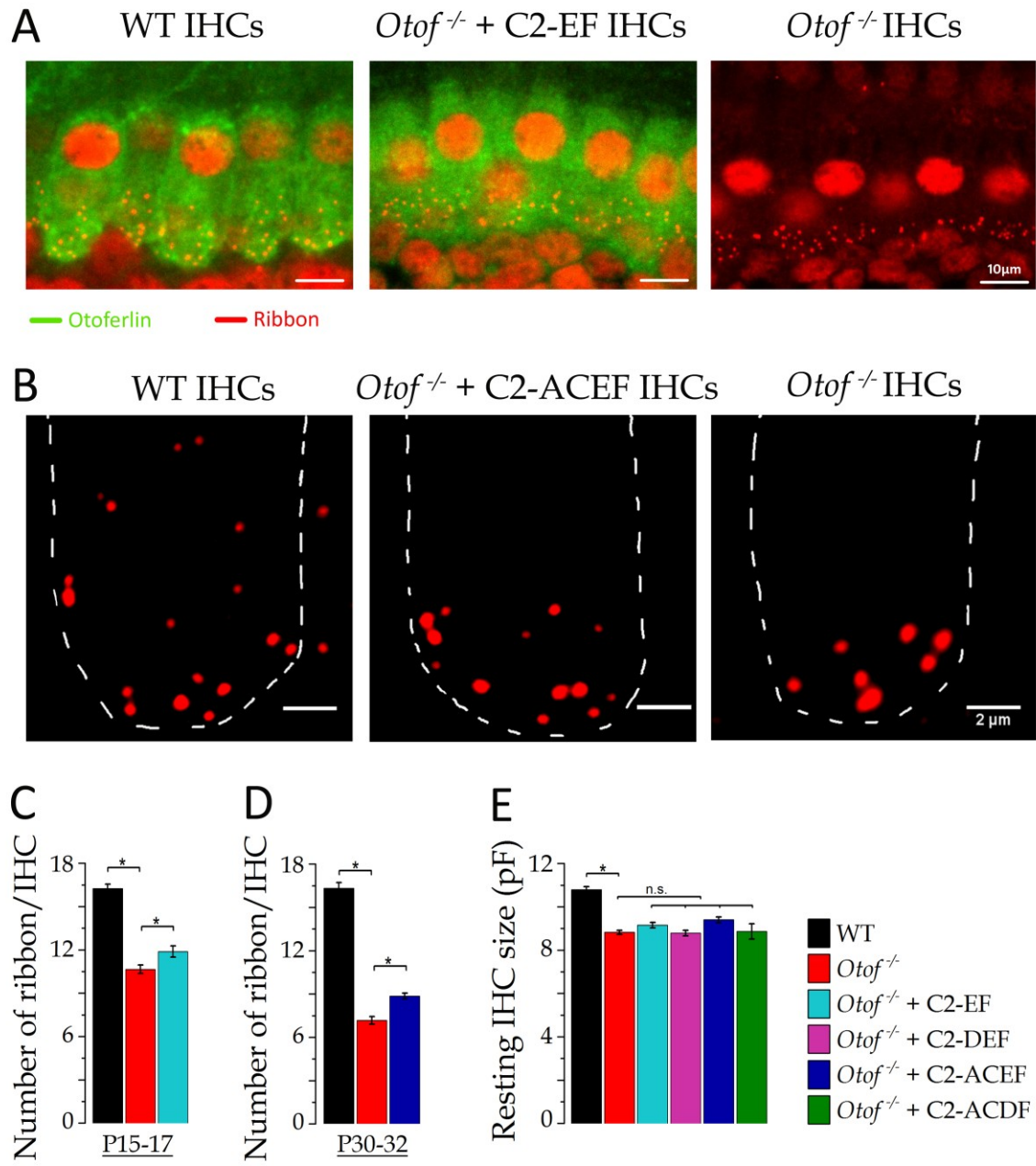




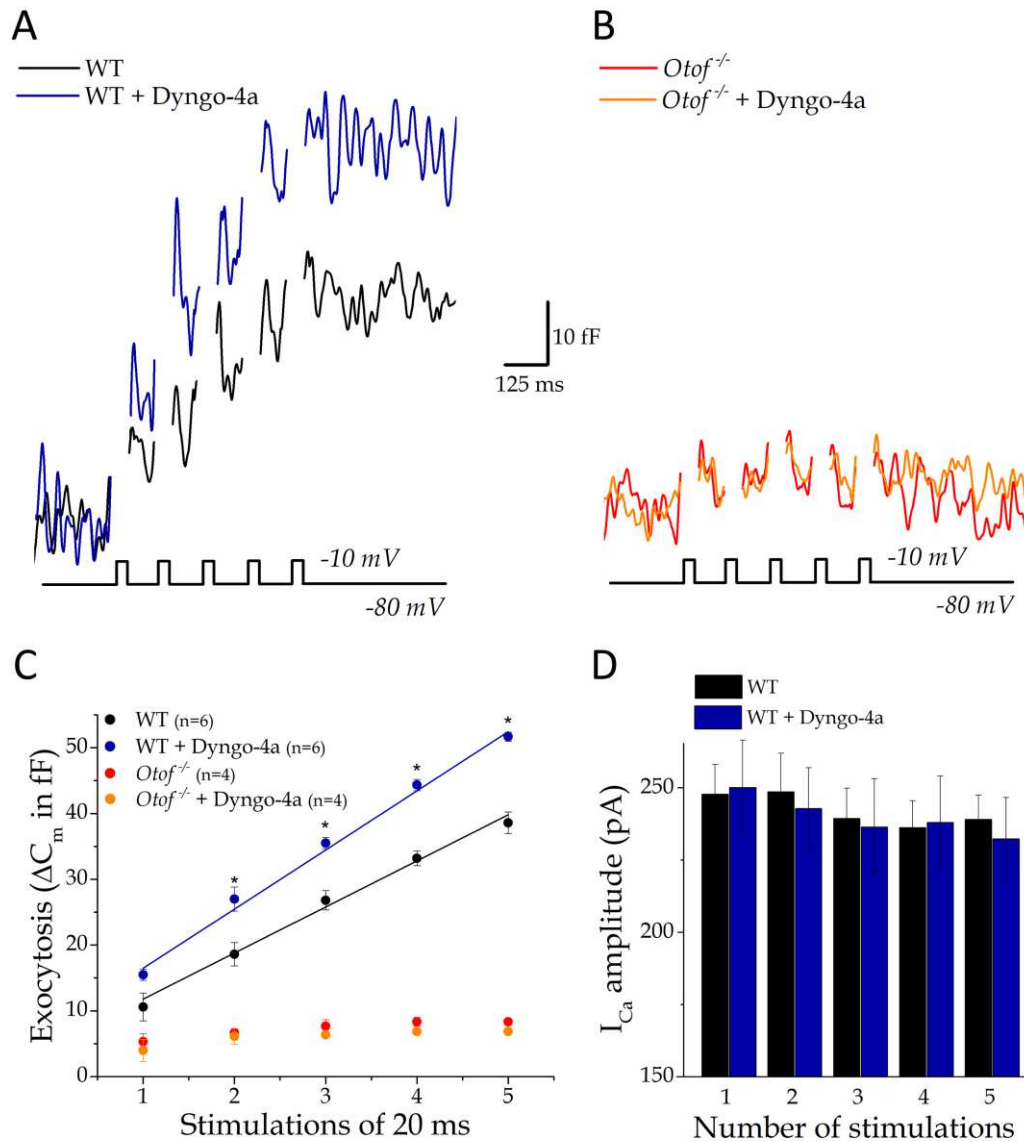
**Figure 3: Mini-*Otof* constructs partially restore RRP exocytosis but not its vesicle resupply in P15-P21 *Otof*<sup>-/-</sup> mice.** (A) Example traces of vesicular exocytosis ( $\Delta C_m$ ) and  $Ca^{2+}$  currents in IHCs triggered by 15 and 25 ms depolarizing steps from -80 mV to -10 mV in WT, *Otof*<sup>-/-</sup> and C2-ACEF, C2-EF, C2-DEF or C2-ACDF injected *Otof*<sup>-/-</sup> mice. (B) Comparative kinetics of RRP exocytosis (depolarizing steps from -80 mV to -10 mV with increasing duration from 5 to 40 ms) for *Otof*-C2-ACEF (dark blue) and C2-EF (light-blue) treated *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs. (C) RRP kinetics in C2-DEF (purple) and C2-ACDF (green). For B and C, note a significant restoration of the exocytotic response as compared to sham *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (two-way ANOVA, \* indicates  $p < 0.05$ ). Kinetics were best fitted with a single exponential with  $R^2 > 0.94$  except for *Otof*-C2ACDF and *Otof*<sup>-/-</sup>. (D) Comparative rate of RRP exocytosis obtained by fitting with a linear function the first 4 time-data points of the kinetics shown in 4B,4C (linear slope in fF/ms). The expression of the mini-*Otof* constructs C2-ACEF, C2-EF or C2-DEF allowed a significant increase in the rate of exocytosis as compared to sham-injected *Otof*<sup>-/-</sup> (one-way ANOVA, \* indicates  $p < 0.05$  and n.s. not significantly different; see individual  $p$  values in Table 2). (E)  $Ca^{2+}$  efficiency of RRP exocytosis ( $\Delta C_m / Q_{Ca}$ ) where the loading charge in  $Ca^{2+}$  ( $Q_{Ca}$ ) was obtained by integrating the  $Ca^{2+}$  current evoked during a voltage step from -80 mV to -10 mV for different brief pulses lasting 5, 10, 15 and 20 ms (full line). The slope of *Otof*-C2-ACEF IHCs was not significantly different of the WT slope ( $2.77 \pm 0.21$  and  $2.09 \pm 0.28$  fF/pC respectively, F-test with  $F = 2.18$  and  $p = 0.23$ ) which is larger than in *Otof*<sup>-/-</sup> mice ( $0.39 \pm 0.20$  fF/pC;  $p = 5.8 \cdot 10^{-3}$ ). For longer pulses (25, 30, 35 and 40 ms; dashed lines) exocytosis  $Ca^{2+}$  efficiency ( $\Delta C_m / Q_{Ca}$ ) in *Otof*-C2-ACEF IHCs is decreased with a slope similar to non-injected *Otof*<sup>-/-</sup> mice ( $0.56 \pm 0.14$  and  $0.50 \pm 0.30$  fF/pC respectively, F-test with  $F = 0.015$  and  $p = 0.98$ ). (F) To evaluate the replenishment of the IHC active zone in vesicle, exocytosis was recorded during a train of 100 ms pulses from -80 mV to -10 mV, each stimulation separated by 100 ms. Examples of exocytotic traces of vesicular recruitment in control WT, *Otof*<sup>-/-</sup> and *Otof*-C2-EF treated IHCs. (G) Comparative mean recruitment in *Otof*-C2-EF, *Otof*-C2-DEF and *Otof*-C2-ACEF treated IHCs. Note that in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (red), the vesicles recruitment is severely impaired. When mini-*Otof* constructs are expressed in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs, the vesicle supply is only slightly, but significantly, restored when compared to the *Otof*<sup>-/-</sup> (two-way ANOVA,  $P = 4.3 \cdot 10^{-8}$ , Tukey's post-hoc test  $p < 10^{-4}$  for each as indicated by the \*), except for *Otof*-C2-ACDF ( $p = 0.16$ ).



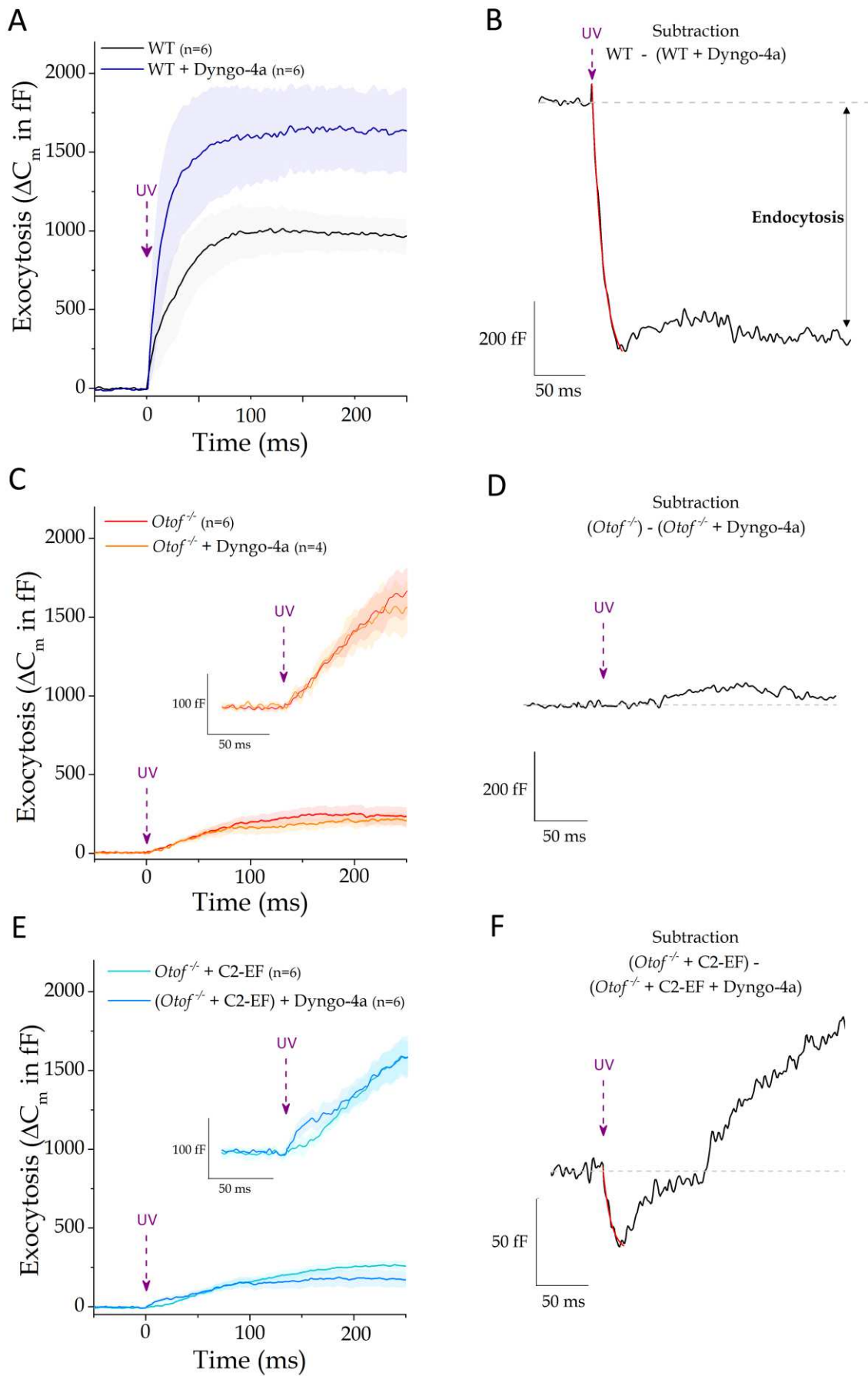
**Figure 4: AAV gene transfer of mini-*Otof* restores the fast inactivating component of the  $\text{Ca}^{2+}$  current in P15-P21 *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs.** (A) IHCs are thought to express long and short C-terminal  $\text{Ca}_v1.3$  isoforms (Scharinger et al., 2015, Vincent et al., 2017). Short C-terminal  $\text{Ca}_v1.3$  channels isoforms ( $\text{Ca}_v1.3_S$ ) are rapidly inactivated by calmodulin (CaM) and are thought to carry the fast component of  $\text{Ca}^{2+}$  current inactivation (Vincent et al., 2017). C-terminal regulatory domains (PCRD and DCRD) of long  $\text{Ca}_v1.3$  isoforms ( $\text{Ca}_v1.3_L$ ) compete with CaM and these channels, representing the major isoforms, do not present fast inactivation. (B) Unlike WT-IHCs (black trace), IHCs lacking otoferlin (red trace) do not display  $\text{Ca}^{2+}$  current with fast inactivation (Vincent et al., 20017). (C) Peak  $I_{Ca}$  ( $I_{Ca}$  total) is significantly diminished in *Otof*<sup>-/-</sup> mice as compared to WT, but the expression of all mini-otoferlins allow the recovery of the  $I_{Ca}$  current (one-way ANOVA, see Table 2). (D) Only when mini-otoferlin C2-DEF is virally-expressed in IHCs, the amplitude of the inactivating component of the  $\text{Ca}^{2+}$  current (fitted with a single exponential over the first 50 ms of the current trace) is significantly recovered as compared to *Otof*<sup>-/-</sup> (Kruskal-Wallis, see Table 2). IHCs were depolarized for 100 ms from -80 mV to -10 mV. \* indicates  $p < 0.05$ .



**Figure 5: Mini-*Otof* constructs partially rescued the synaptic ribbon numbers and the resting size in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs.** (A) Using immunofluorescent confocal imaging, we quantified the number of synaptic ribbons (red dots) at P15-P17 in IHCs from mice WT, *Otof*<sup>-/-</sup> expressing otoferlin C2-EF domain and *Otof*<sup>-/-</sup>. The green signal indicates otoferlin expression in WT and C2-EF but not in non-injected *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (B) Immunolabeling examples of synaptic ribbons (at larger magnification; without otoferlin immunolabeling) in P30-P32 IHCs from WT (control) mouse, *Otof*<sup>-/-</sup> mouse injected with C2-ACEF and non-injected *Otof*<sup>-/-</sup> mouse. The dashed white line delineates the cell contour at the basal synaptic area of one IHC for each category (C) Comparative ribbon histogram at P15-P17 for C2-EF: IHCs of *Otof*<sup>-/-</sup> mice displayed a largely reduced number of ribbon ( $10.7 \pm 0.3$ , n = 70 IHCs, 3 mice) as compared to WT mice ( $16.2 \pm 0.3$ , n = 40 IHCs, one-way ANOVA,  $p < 10^{-4}$ ). The *Otof*-C2-EF expression in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs had a significantly larger number of ribbon per cell ( $11.9 \pm 0.4$ , n = 43 IHCs) as compared to control non-injected *Otof*<sup>-/-</sup> mice ( $10.7 \pm 0.3$ , n = 70 IHCs; one-way ANOVA,  $p = 0.022$ ). (D) Comparative histograms at P30-P32 for C2-ACEF: IHCs of C2-ACEF injected mice also displayed a significant preservation of synaptic ribbon ( $8.8 \pm 0.2$ , n = 31 IHCs) as compared to control untreated *Otof*<sup>-/-</sup> mice ( $7.1 \pm 0.3$ , n = 56 IHCs, Kruskal-Wallis,  $p = 1.8 \cdot 10^{-3}$ ). (E) The resting size of *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs, measured in whole cell recording at -70 mV, was diminished as compared to the WT IHCs resting size ( $8.8 \pm 0.09$  pF, n = 53;  $10.79 \pm 0.14$  pF, n = 43 respectively, one-way ANOVA,  $p < 10^{-4}$ ). None of the mini-*Otof* significantly restored the resting size of IHCs (one-way ANOVA,  $p > 0.05$  for each as compared to *Otof*<sup>-/-</sup> mice).

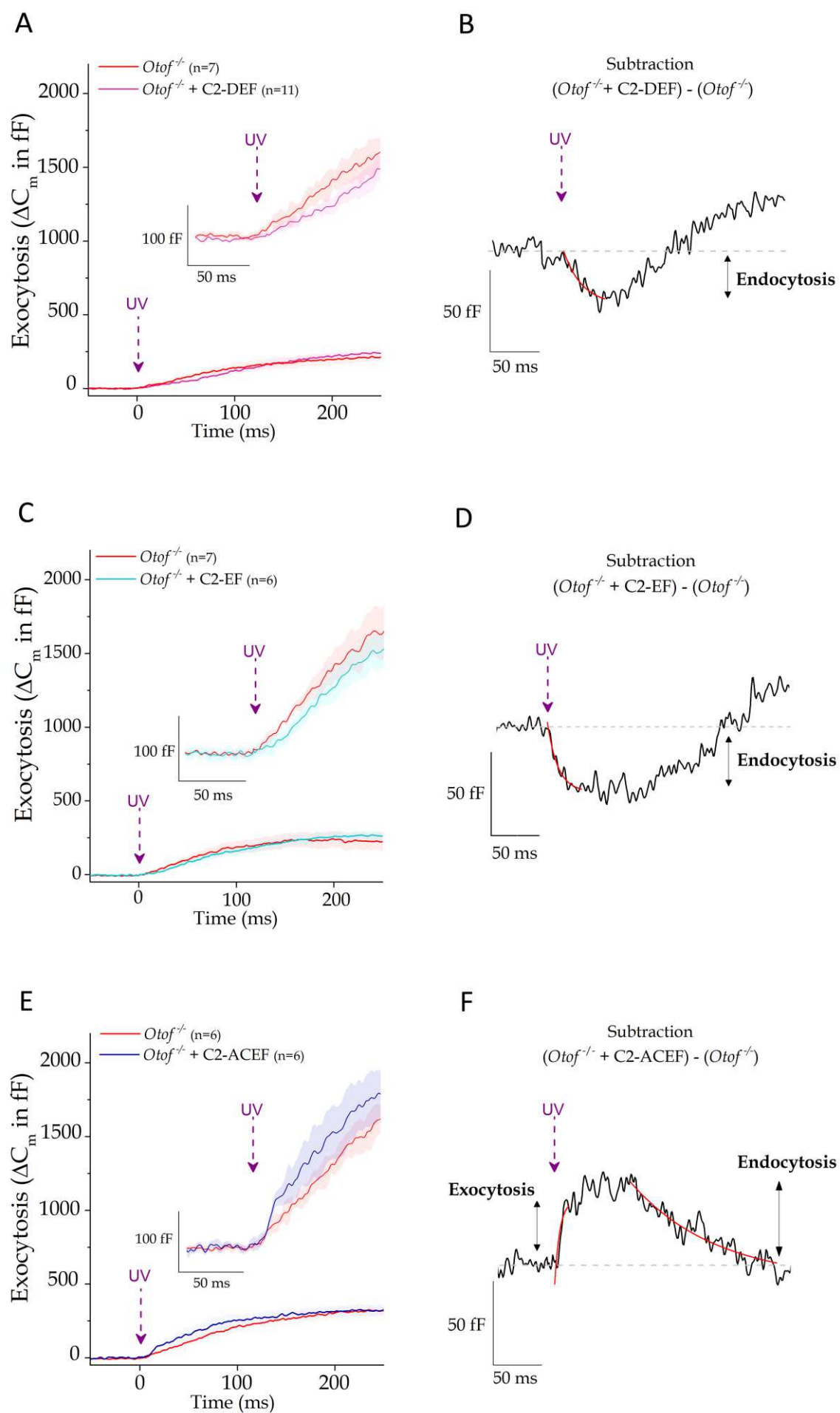


**Figure 6: The effect of a dynamin inhibitor on RRP exocytosis** We tested the effect of 30  $\mu$ M Dyngo-4a (dynamin inhibitor) on the  $\Delta C_m$  response in P15-P21 IHCs from WT (A) and in *Otof*<sup>-/-</sup> mice (B), by applying five consecutive brief 20 ms-depolarizing pulses. (C) The presence of Dyngo-4a increased the net  $\Delta C_m$  responses in WT IHCs by blocking endocytosis (\* indicates  $p < 0.05$  for each stimulations, unpaired-t-test). Dyngo-4a did not affect the  $\Delta C_m$  responses in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs. (D) The increase in  $\Delta C_m$  responses in WT IHCs was not the result of augmented  $Ca^{2+}$  currents since similar amplitudes were found in presence or absence of the endocytotic inhibitor.

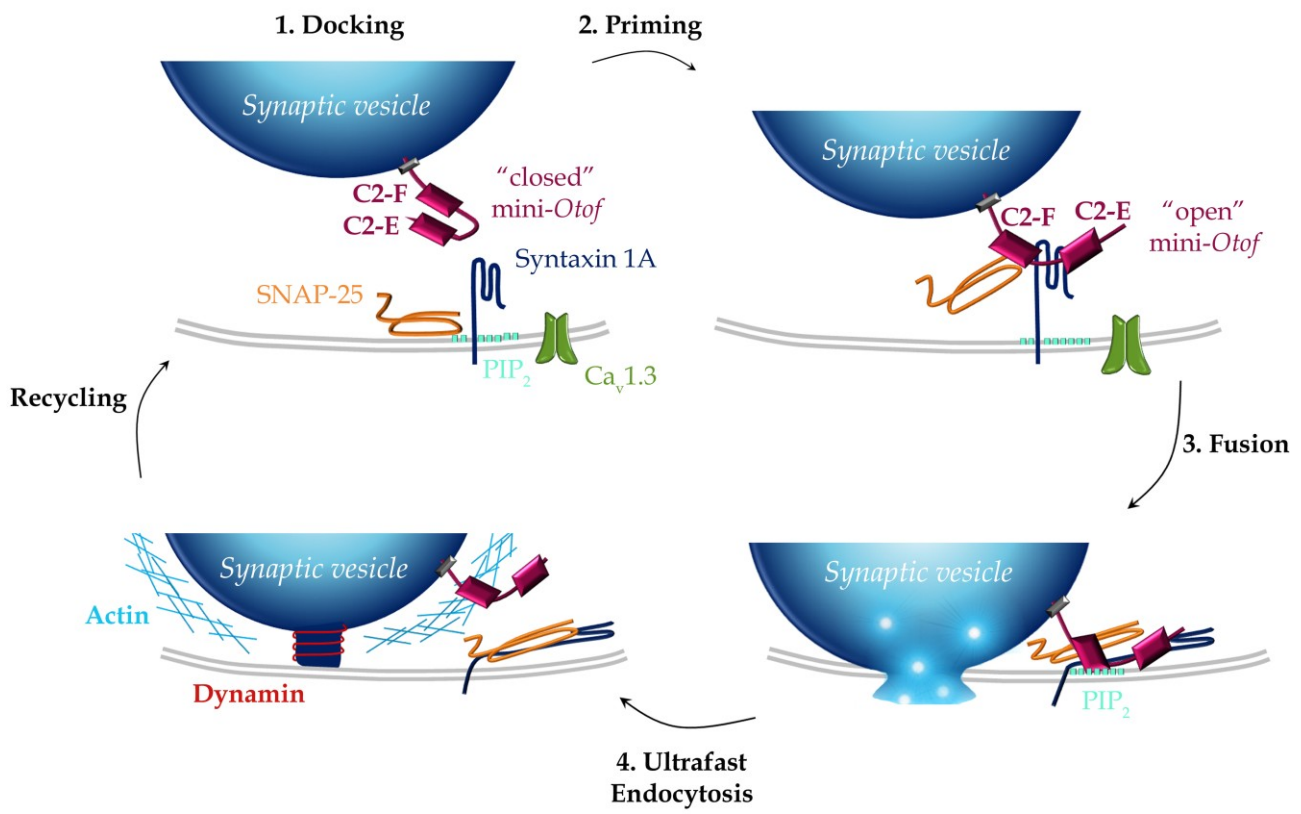


**Figure 7: Dyngo-4a effects on exocytosis evoked by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging (A)** We tested the effect of Dyngo-4a on the exocytotic responses evoked by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging in WT P15-P21 IHCs. In presence of Dyngo-4a (dark blue), we observed an increased in the kinetics and amplitude of the  $\Delta C_m$  responses. **(B)** The subtraction of the  $\Delta C_m$  responses reveals the presence of an ultrafast endocytosis (best fitted with a single exponential with  $\tau = 10.9 \pm 0.5$  ms). **(C-D)** The presence of Dyngo-4a has no effect on exocytosis in *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs. **(E)** When Dyngo-4a was added to *Otof*-C2-EF IHCs, the initial rate of the exocytotic response was transiently increased. **(F)** The subtraction of the  $\Delta C_m$  responses revealed a transient ultrafast endocytosis ( $\tau = 7.6 \pm 1.0$  ms) followed by exocytosis.





**Figure 8: AAV gene transfer of mini-otoferlins revealed otoferlin-dependent ultrafast endocytosis in IHCs.** (A) Uncaging intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in P15-P21 IHCs from mouse injected with AAV8-*Otof*-C2-DEF (purple trace) displayed an initial drop in their  $\Delta C_m$  responses as compared to non-injected *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (red trace). (B) Subtracting the  $\Delta C_m$  responses of C2-DEF injected from the non-injected *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs indicated a transient ultrafast endocytosis that could be fitted with a single exponential with  $\tau = 16.0 \pm 4.7$  ms. This transient endocytosis was followed by exocytosis. (C-D) C2-EF injection (blue-light trace) also showed a transient initial ultrafast endocytosis ( $\tau = 10.7 \pm 1.3$  ms) (E) IHCs from mouse injected with AAV8-*Otof*-C2-ACEF (dark blue trace) showed an initial transient increase of the exocytotic response that was followed by a rapid endocytosis as compared to non-injected *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs (red trace). (F) The subtraction of the  $\Delta C_m$  responses (inset, black trace) indicated a transient exocytosis ( $\tau = 5.2 \pm 2.5$  ms) followed by a fast endocytotic response ( $\tau = 87.2 \pm 12.9$  ms). Note that for each condition, new *Otof*<sup>-/-</sup> IHCs were simultaneously recorded in the same set of experiments. For each condition, traces are means from n IHCs indicated into brackets.



**Figure 9: Schematic model for the engagement of the mini-otoferlin C2-EF in the synaptic vesicle cycle (exo-endocytosis) at the IHC active zone**

- 1) Docking: the mini-*Otof* C2-EF, attached by its C-terminal transmembrane domain to the glutamatergic docked vesicles, is not yet engaged in direct interactions with the t-SNAREs (Syntaxin 1A and SNAP-25) and the phospholipids PIP<sub>2</sub> at the plasma membrane. At low intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, when nearby Ca<sup>2+</sup> channels are not voltage-activated, the mini-otoferlin is folded and its C2-E and C2-F domains interact with each other.
- 2) Priming: during voltage activation of the Ca<sup>2+</sup> channels, Ca<sup>2+</sup> increased and vesicles undergo a priming reaction where mini-*Otof* conformation shift from "closed" to "open" form and interact with t-SNARE forming a complex. Syntaxin 1A has been proposed to interact with C2-E and C2-F domains and SNAP-25 only with C2-F (Ramakrishnan et al. 2014). This step of the vesicle cycle is poorly restored by *Otof*-C2-EF, C2-DEF, C2-ACEF and C2-ACDF (recruitment, Fig. 3G) explaining the absence of hearing restoration (Fig 2). The molecular interactions of the mini-*Otof*-complex with the Ca<sub>v</sub>1.3 channels are not represented.
- 3) Fusion: When Ca<sup>2+</sup> ions bind to the C2 domains of mini-*Otof*, the synaptic vesicle membrane and the plasma membrane are forced into close proximity by the SNARE complex, triggering partial insertion of the C2-F domain into PIP<sub>2</sub> and resulting in vesicle fusion. This step of vesicle fusion is partially restored by *Otof*-C2-EF, C2-DEF and C2-ACEF.
- 4) Ultrafast vesicle endocytosis: mediated by dynamin which pinch off the vesicular membrane with the help of filamentous F-actin for initializing the membrane curvature. This ultrafast endocytosis was efficiently observed with *Otof*-C2-EF, C2-DEF, C2-ACEF and C2-ACDF that could interact with the dynamin process.

**Table 1: Sense and antisens primers used**

Name of primers	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp) for ACEF	Product size (bp) for ACDF
231s 1494as	gatagggaccttctgcatgg gaagacgacctgctcattcc	454	454
1478s 2720 as	atgagcaggtcgtcttcac ggcataggcgatacgtttgt	1142	1142
1478s 4563as	atgagcaggtcgtcttcac gatgtcggcttgcctaact	1146	/
1478s 2919as	atgagcaggtcgtcttcac ggcttgcttcttggtgtag	/	1341

**Table 2 : Summary of exocytosis properties** (p values indicating individual comparison with *Otof*<sup>-/-</sup>)

		WT	<i>Otof</i> <sup>-/-</sup> + C2-EF	<i>Otof</i> <sup>-/-</sup> + C2-DEF	<i>Otof</i> <sup>-/-</sup> + C2-ACEF	<i>Otof</i> <sup>-/-</sup> + C2- ACDF	<i>Otof</i> <sup>-/-</sup>
Fig. 3D one-way ANOVA P = 1.15 10 <sup>-10</sup>	RRP rate (fF / ms)	0.51 ± 0.07 (n=12)	0.35 ± 0.06 (n=14)	0.27 ± 0.05 (n=6)	0.49 ± 0.07 (n=10)	0.17 ± 0.02 (n=9)	0.028 ± 0.012 (n=19)
			*p = 2.2 10 <sup>-5</sup>	*p = 0.047	*p = 2.7 10 <sup>-8</sup>	p = 0.308	
Fig. 3E F-test	RRP Ca <sup>2+</sup> efficiency (fF / pC) (full line)	2.77 ± 0.21 (n=10)	1.49 ± 0.23 (n=10)	0.47 ± 0.12 (n=6)	2.09 ± 0.28 (n=9)	0.50 ± 0.24 (n=9)	0.39 ± 0.20 (n=10)
			p = 0.058	p = 0.97	*p = 0.018	p = 0.92	
Fig. 4C one-way ANOVA P = 1.35 10 <sup>-3</sup>	I <sub>Ca</sub> total (pA)	205 ± 13 (n=13)	204 ± 7 (n=20)	207 ± 9 (n=7)	203 ± 7 (n=10)	202 ± 7 (n=10)	159 ± 14 (n=16)
			*p = 0.006	*p = 0.019	*p = 0.025	*p = 0.022	
Fig. 4D Kruskal- Wallis P = 1.5 10 <sup>-6</sup>	Fast I <sub>Ca</sub> inactivation (pA)	20.2 ± 4.0 (n=12)	11.6 ± 2.7 (n=19)	18.7 ± 3.1 (n=7)	8.1 ± 3.2 (n=10)	0.6 ± 0.4 (n=10)	5.0 ± 1.8 (n=17)
			p = 0.249	*p = 0.030	p = 0.999	p = 0.999	

**Table 3 : Summary of ultrafast endocytosis**

(-) indicates a non-measurable endocytosis

Subtraction		Amplitude (fF)	Time constant (ms)	Mean maximal rate $dC_m/dt$ (fF/ms)
Fig. 7B	WT (n=6) - (WT + Dyngo-4a) (n=6)	737.1	10.9 ± 0.5	70.7
Fig. 7D	<i>Otof</i> <sup>-/-</sup> (n=6) - ( <i>Otof</i> <sup>-/-</sup> + Dyngo-4a) (n=4)	-	-	-
Fig. 7F	C2-EF (n=6) - (C2-EF + Dyngo-4a) (n=6)	44.7	7.6 ± 1.0	7.9
Fig. 8D	( <i>Otof</i> <sup>-/-</sup> + C2-EF) (n=6) - ( <i>Otof</i> <sup>-/-</sup> ) (n=7)	38.2	10.7 ± 1.3	5.0
Fig. 8B	( <i>Otof</i> <sup>-/-</sup> + C2-DEF) (n=11) - ( <i>Otof</i> <sup>-/-</sup> ) (n=7)	35.8	16.0 ± 4.7	7.0
Fig. 8F	( <i>Otof</i> <sup>-/-</sup> + C2-ACEF) (n=6) - ( <i>Otof</i> <sup>-/-</sup> ) (n=6) (exocytosis)	57.3	5.2 ± 2.5	6.9
	( <i>Otof</i> <sup>-/-</sup> + C2-ACEF) (n=6) - ( <i>Otof</i> <sup>-/-</sup> ) (n=6) (endocytosis)	65.7	87.2 ± 12.9	0.8
Data not shown	( <i>Otof</i> <sup>-/-</sup> + C2-ACDF) (n=8) - ( <i>Otof</i> <sup>-/-</sup> ) (n=7)	32.7	21.5 ± 10.7	1.6

# Article 3

**The use of CRISPR-Cas9 genome editing *in vivo* to probe the role of Ca<sub>v</sub>1.3 Ca<sup>2+</sup> channel isoforms in synaptic transmission of mouse auditory hair cells**

Tertrais M, Peineau T, Leclère JC, Bouleau Y, and Dulon D (2018)  
(manuscrit en préparation)



**Introduction :**

La fusion des vésicules synaptiques des cellules ciliées internes (CCI) est régulée par l'otoférine et des canaux calciques  $Ca_v1.3$  de type L, agrégés aux zones actives (ZA). D'un épissage alternatif de l'exon 43 du gène *CACNA1D* résulte deux isoformes du canal  $Ca_v1.3$  dans sa partie C-terminale régulatrice : l'isoforme longue ( $Ca_v1.3_L$ ) et l'isoforme courte ( $Ca_v1.3_S$ ). Les isoformes  $Ca_v1.3_S$  présentent une inactivation rapide due à la liaison de la calmoduline (CaM) tandis que les isoformes  $Ca_v1.3_L$ , possédant une région C-terminale régulatrice dans son intégrité, ne présentent pas ou peu d'inactivation par la CaM. Le rôle spécifique de ces deux isoformes de canaux calciques  $Ca_v1.3$  dans la régulation du cycle des vésicules synaptiques des CCI reste inconnu. Dans cette étude, nous avons exploré par la technologie CRISPR-Cas9, *in vivo* chez la souris, l'impact sur la fonction auditive d'une édition génique spécifique de l'exon 43 du gène *CACNA1D*, permettant de stopper spécifiquement l'encodage des formes longues  $Ca_v1.3_L$  tout en maintenant l'expression des formes courtes  $Ca_v1.3_S$  dans les CCI.

**Résultats :**

- Les souris dont les isoformes  $Ca_v1.3_L$  des CCI ont été édités par CRISPR-Cas9 (CCI CRISPR- $Ca_v1.3_L$ ) présentent une surdité sévère (élévation des seuils de  $\sim 30$  dB) alors que les produits de distorsions restent normaux, révélant ainsi le développement d'une synaptopathie auditive
- Les courants calciques des CCI CRISPR- $Ca_v1.3_L$  décrivent une inactivation rapide plus importante. Celle-ci est accompagnée d'un décalage de la voltage-dépendance de la courbe d'activation de l'exocytose de 6 mV vers les potentiels positifs, suggérant une transmission synaptique au voisinage du potentiel de repos des CCI moins efficace.
- L'exocytose rapide et transitoire des vésicules synaptiques des CCI CRISPR- $Ca_v1.3_L$  reste inchangée. La composante soutenue de l'exocytose est cependant altérée, indiquant un déficit de recrutement vésiculaire aux zones actives.

**Conclusion :**

Nos résultats montrent que, suite à la suppression de l'expression d'un exon spécifique dans les CCI chez la souris, *in vivo* en post-natal, les isoformes  $Ca_v1.3_L$  sont indispensables à l'audition. En effet, ces isoformes à faible inactivation permettent sûrement une diffusion calcique intracellulaire importante et profonde, recrutant les vésicules aux zones actives, une étape indispensable pour l'exocytose soutenue et infatigable des CCI. Les isoformes  $Ca_v1.3_S$  semblent être suffisantes au déclenchement rapide et transitoire des vésicules prêtes à fusionner avec la membrane plasmique des ZA.

**THE USE OF CRISPR-Cas9 GENOME EDITING *IN VIVO* TO PROBE  
THE ROLE OF Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> CHANNEL ISOFORMS  
IN SYNAPTIC TRANSMISSION OF MOUSE AUDITORY HAIR CELLS**

**Margot Tertrais, Thibault Peineau, Jean-Christophe Leclère,  
Yohan Bouleau and Didier Dulon\***

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

\* Corresponding authors: didier.dulon@inserm.fr

**Acknowledgments:** This work was in part supported by grants from the *Fondation Pour l'Audition*. We thank Christine Petit and Danuta Oficjalska for helpful discussion.

## ABSTRACT

Transmitter release at auditory inner hair cell (IHCs) ribbon synapses is known to be regulated by presynaptic L-type Cav1.3 calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) channels which are constituted of long (Cav1.3L) and short (Cav1.3s) C-terminal isoforms, with respectively slow (sec) and extremely fast (ms) time inactivation. The expression of Cav1.3L and Cav1.3s results from the alternative splicing of exon 43 in the *CACNAID* gene. The specific role of these Cav1.3 channel isoforms in auditory IHCs remain unknown. Here we investigated the impact on the hearing function of a specific IHCs genome editing of exon 43, affecting only Cav1.3L isoform, through CRISPR-Cas9 technology, *in vivo*, in postnatal mice. We found that specific truncation of the Cav1.3L isoform in IHCs generated severe deafness in mice. Electrophysiological patch-clamp recordings in IHCs of these mice showed  $\text{Ca}^{2+}$  currents with larger amplitude and increased inactivation. Furthermore, capacitance measurements displayed a normal fast and transient exocytosis of synaptic vesicles that was, however, associated with a severe defect in the sustained component of exocytosis, indicating a deficit in the recruitment of synaptic vesicles to the hair cell active zone. Our work demonstrates that the slowly inactivating Cav1.3L isoform, likely by allowing a deep  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion into the IHC active zone, is essential to mobilize distant synaptic vesicles for an endless and inexhaustible auditory synaptic transmission by hair cells.

## INTRODUCTION

The presynaptic active zone (AZ) of auditory inner hair cells (IHCs) is delineated by an electron-dense structure, called ribbon, to which are attached several hundred of synaptic glutamatergic vesicles. This synaptic organelle is located perpendicular and above the AZ plasma membrane where L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels are tightly clustered. Genetic studies in mice have shown that these  $\text{Ca}^{2+}$  channels are essentially composed of the  $\alpha_1$  pore-forming subunit Cav1.3, encoded by the *CACNA1D* gene (Platzer et al., 2000; Brandt et al., 2003; Dou et al., 2004). Remarkably, a tight synaptic organization of Cav1.3 channels provides a fast and a focalized voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  entry at the AZ where synaptic vesicles undergo fast and indefatigable exocytosis (Brandt et al., 2005; Frank et al., 2009; Vincent et al., 2014). Whole-cell patch-clamp measurements of membrane capacitance during voltage-step depolarization have shown that exocytosis displays two components in IHCs: first a fast component reflecting the immediate fusion of vesicles docked and primed at the AZ plasma membrane, forming the readily releasable pool (RRP) and a second a slower component reflecting the replenishment rate of the AZ in synaptic vesicles (Moser and Beutner, 2000; Spassova et al., 2004; Johnson et al., 2005). Both components have been shown to be  $\text{Ca}^{2+}$ -dependant (Spassova et al., 2004; Levic et al., 2011; Vincent et al., 2017) and proposed to involve the activation of different Cav1.3 channel isoforms (Vincent et al., 2017). Indeed, IHCs express long (Cav1.3<sub>L</sub>) and short (Cav1.3<sub>S</sub>) C-terminal Cav1.3 isoforms (Scharinger et al., 2015) and Cav1.3<sub>L</sub> isoforms, based on differential pharmacological sensitivity to nifedipine, have been shown to be essential for vesicular replenishment of the AZ during sustained release (Vincent et al., 2017).

The expression of Cav1.3<sub>L</sub> and Cav1.3<sub>S</sub> results from the alternative splicing of exon 43 in the *CACNA1D* gene and these Cav1.3  $\text{Ca}^{2+}$  channel isoforms have different gating properties including different voltage-dependent activation and time-dependent inactivation (Bock et al., 2011; Huang et al., 2013). Cav1.3<sub>S</sub> channel isoforms have a truncated regulatory C-terminal region that allows a more efficient  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent binding of calmodulin (CaM) to the IQ and pre-IQ domains, generating then a fast inactivation of the  $\text{Ca}^{2+}$  current (Peterson et al., 1999; Qin et al., 1999; Catterall, 2011; Erickson et al., 2003; Liu et al., 2010; for review see Striessnig et al., 2014). Cav1.3<sub>L</sub> isoforms, harboring a complete regulatory C-terminal region with a proximal and a distal domain (PCRD for "proximal C-terminal regulatory domain" and DCRD for "distal C-terminal regulatory domain") display poor and slow inactivation. Indeed, the three-dimensional structures of these regulatory domains compete

with CaM at the IQ and pre-IQ domains, and thus channel inactivation and opening probability are decreased as well as voltage sensitivity is shifted toward negative potentials (Singh et al., 2008; Liu et al., 2010; Bock et al., 2011).

The C-terminal regulatory region of Cav1.3 channels also determines the sensitivity of these Ca<sup>2+</sup> channel isoforms to dihydropyridines, such as nifedipine (Huang et al., 2013). Cav1.3<sub>S</sub> channels are weakly sensitive to nifedipine, unlike Cav1.3<sub>L</sub> isoforms, which are blocked at micromolar concentration by this drug. A Ca<sup>2+</sup> current resistant to nifedipine, likely mediated by Cav1.3<sub>S</sub> channels, is sufficient to trigger normal fusion of RRP vesicles in IHCs but the sustained component of exocytosis is inhibited, suggesting that the poorly inactivating Cav1.3<sub>L</sub> channels are essential for vesicular replenishment at the AZ (Vincent et al. 2017).

In order to directly test this latter hypothesis at the molecular level, we here investigated the impact on the hearing function of a specific hair cell genome editing of exon 43, an exon required for encoding Cav1.3<sub>L</sub> isoform, through CRISPR-Cas9 technology, *in vivo*, in postnatal mice. We found that mice treated with CRISPR-Cas9 displayed largely increased hearing thresholds with normal otoacoustic-emissions from outer hair cells (OHCs), thus indicating an auditory IHCs afferent synaptopathy when editing Cav1.3 exon 43. Electrophysiological patch-clamp recordings of IHCs from these mice showed normal Ca<sup>2+</sup>-evoked RRP exocytosis that was, however, associated with a severe defect in sustained exocytosis, indicating a deficit in vesicle recruitment to the active zone. Our results demonstrate that Cav1.3<sub>L</sub> Ca<sup>2+</sup> channel isoforms are required for hearing in mice and more specifically for sustained synaptic transmission between IHCs and afferent auditory nerve fibers.

## METHODS

### *Animals*

We use two mice line: the *Myo15<sup>tm1.1(cre)Ugds</sup>* mice (Caberlotto et al., 2011) carrying the cre-recombinase gene driven by the myosin-15 promoter, which is specific of hair cells; and *B6.129-Igs2<sup>tm1(CAG-cas9\*)Mmw/J</sup>* knock-in mice (Jackson Laboratory; mouse strain 027632) having a loxP-flanked STOP (LSL) cassette preventing expression of the downstream Cas9 sequence. By crossing these two mice line we generated mice with a specific hair cell expression of Cas9 (Fig. 1). The excision of the LSL in the genome of the hair cells was verified by PCR and the expression of Cas9 was verified by RT-PCR from IHCs (data not shown).

### *gRNA design and viral vector constructs*

The endonuclease activity of the Cas9 is guided by a guide RNA (gRNA) with sequence homology to a given locus, where it induces a double stranded break (DSB). Here we designed a target sequence in exon 43 of the *CACNAID* gene, after the stop codon of *Cav1.3<sub>43s</sub>*. The DSB induced by Cas9 is repaired through non-homologous end joining (NHEJ), an error-prone process that produces insertions/deletions, and will conduct to the disruption on the target exon 43 without affecting *Cav1.3<sub>s</sub>* isoforms. The Cas9 edited *CACNAID* gene then would lead to truncated forms of *Cav1.3* channels which do not carry the long C-ter regulatory part.

In order to design the gRNA targeting exon 43 and to minimize off-targeting effect, we used a computational CRISPR design tool (<http://crispor.tefor.net>; Haeussler et al., 2016). We choose the following gRNA with a high specificity score of 92 (ranges from 0-100 and measures the uniqueness of a guide in the genome, the higher the specificity score, the lower are off-target effects in the genome) in the reverse strand: ' AATGCTGGGCGGCTTTCCGT 5' with PAM sequence CCC, corresponding to nucleotide 5319 of the *CACNAID* gene. The analysis showed a low probability of interference with off-targets. There were only three possible off-targets that had 4 mismatches. These mismatches were close to the PAM even lowering the probability of Cas9 editing (Table 1).

The gRNA was delivered by intracochlear injection of Adeno-associated-virus (AAV) through the round window of P2-P4 mice (see paragraph below). The murine gRNA sequence (AATGCTGGGCGGCTTTCCGT) was cloned into an AAV-U6/TO-gRNA(exon47)-CMV-TetR-P2A-eGFP-KASH-pA plasmid (pJEP10; Addgene). This plasmid containing the gRNA

was subcloned into AAV2 genome and packaged in AAV8 capsid (Penn Vector Core; Pennsylvania) as described in (Emptoz et al., 2017). The gRNA expression was driven by the ubiquitous U6 promoter and the eGFP reporter gene, allowing a monitoring of transfected IHCs, was driven by the CMV promoter.

Gene symbol	Sequence - PAM	Predicted function	Location	CFD score
Tbc1d13	AATGCTGAGAGGCCTTCCCTAGG	Positive regulation of Rab35 GTPase activity	chr2	0.111
Syce2	AAGGCTGTGGGGCTTCCCTAGG	Synaptonemal complex central element protein (meiosis)	chr8	0.054
Cspg5	AATCCAGGGCGGCCTTCCGCAGG	Proteoglycan that function as a differentiation factor.	chr9	0.012

**Table 1 : Off-target identified.** The table recapitulates gene where off-target have been found, ranked by CFD score (Doench et al., 2016) from most to least likely. The presence of mismatches close the to PAM are poorly tolerated by Cas9, increasing the likelihood the the exon 43 of CACNA1D gene will be selectively edited (Komor et al., 2017). The presence of these off-target in the inner ear was found in SHIELD database (<https://shield.hms.harvard.edu/>)

#### *Round window membrane injection*

The AAV8 vector containing the gRNA sequence was injected in the cochlea of P2-P4 mice at a titer of  $5.75 \times 10^{13}$  genome copies (gc)/ml and AAV8 with no inserted gRNA was used as control at a titer of  $3.34 \times 10^{13}$  gc/ml. Protocols were approved by the Animal Care and Use committee of the University of Bordeaux. Intracochlear viral transduction was carried out as previously described (Emptoz et al., 2017; Dulon et al., 2018). Mice were anesthetized using hypothermia exposure. A left post-auricular incision was made to expose the otic bulla and to visualize the cochlea. A glass micropipette containing 1 $\mu$ l of AAV8 vector preparation was inserted through the round window membrane (RWM) and injected into the cochlea. The pipette was removed, the hole in the membrane was covered with connective tissue, and the incision was sealed with biological glue (3M Vetbond). Standard post-operative care was applied.

### *Auditory Brainstem Responses*

To record ABRs (Auditory Brainstem Responses, which represent the sound-evoked synchronous firing of the auditory cochlear nerve fibers) as well as distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs, which reflect the amplification provided by OHCs), mice were anesthetized with intraperitoneal injection of xylazine (6 mg/ml) and ketamine (80 mg/ml) mixture (Rompun, #KP091XW and Vibrac, #4C14) diluted in physiological saline. The mouse body temperature was kept constant at 37°C. For stimulus generation and data acquisition, we used a TDT RZ6/BioSigRZ system (Tucker-Davis Technologies). ABR signals were averaged after the presentation of a series of 512 stimulations. ABR thresholds were defined as the lowest stimulus for recognizable wave-I and II. The amplitude of ABR wave-I was estimated by measuring the voltage difference between the positive (P1) and negative (N1) peak of wave-I. Pure tone stimuli were used at frequencies of 4, 8, 16, 24 and 32 kHz. Sound intensities of 10 to 90 dB SPL, in 10 dB step, were tested.

### *Tissue preparation of the organ of Corti*

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 xylazin (6 mg/ml) and ketamine (80 mg/ml) mixture (Rompun, #KP091XW and Vibrac, #4C14) diluted in physiological saline. Electrophysiological recordings from IHCs were obtained in whole-mount organ of corti (OC) from mice at postnatal days 15-21 (P15-P21); that is, after the onset of hearing. The OC was freshly dissected under binocular microscopy 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 then 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 coupled to a C2 confocal fluorescent imaging system. The extracellular solution was complemented with 0.25 μM of apamin (Latoxan; cat # L8407) and 1 μM of XE-991 (Tocris Bioscience; cat # 2000) to block SK channels and KCNQ4 channels, respectively. The external Ca<sup>2+</sup> concentration was increased from 1.3 to 5 mM to enhance the amplitude of Ca<sup>2+</sup> currents to levels nearby body temperature. All experiments were performed at room temperature (22°C–24°C).



### *Patch-clamp 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, using an EPC10 amplifier controlled by Patchmaster pulse software (HEKA Elektronik). Only eGFP expressing IHCs were recorded. 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 2 to 4 M $\Omega$ . Patch pipettes were filled with an intracellular cesium-based solution containing (in mM) : CsCl 145; MgCl<sub>2</sub> 1; HEPES 5; EGTA 1; TEA 20; ATP 2 and GTP 0.3; pH 7.2, 300 mOsm. Changes in cell membrane capacitance ( $\Delta C_m$ ) were used to monitor fusion of synaptic vesicles during exocytosis.  $C_m$  was measured accordingly to the Lindau-Neher technique (Lindau and Neher, 1988) by using the Lock-in amplifier Patchmaster software (HEKA) and applying a 1kHz command sine wave (amplitude 20mV) at holding potential (-80mV) before and after the pulse experiment. Because recording conditions can greatly influence capacitance measurements, only IHC patch clamp recordings with low series resistance below 10 M $\Omega$  and a maximum leak current of 25 pA (at  $V_h = -70$  mV), were considered in the present study.

### *Voltage stimulation*

The readily releasable pool (RRP) of exocytosis was recorded during a protocol in which IHCs were depolarized from -80 mV to -10 mV with increasing durations from 5 to 40 ms in 5 ms increments. The recovery of RRP exocytosis (vesicle recruitment) was recorded during a protocol of 5 consecutive stimulations of 100 ms, each separated with 240 ms time inter-pulse or during a train of 100 ms pulses from -80 mV to -10 mV.

### *Data Analysis*

Data were analyzed using Patchmaster (HEKA Elektronik, Germany) and Origin 9.1 (OriginLab). Means are expressed  $\pm$  SEM. They were compared either using two-tails Student's t-test for normally distributed data or Mann-Whitney test for non Gaussian distributed data. Otherwise, for multi-parametric analysis, we used a two-way ANOVA. In the graphs \* indicates statistical significance with  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### CRISPR/Cas9 targeting of exon 43 of *CACNA1D* gene in mouse cochlear hair cells

We crossed *Myo15<sup>tm1.1(cre)Ugds</sup>* (Caberlotto et al., 2011) and *B6.129-Igs2<sup>tm1(CAG-cas9\*)Mmw/J</sup>* knock-in mice line to obtain mice expressing Cas9 specifically in cochlear hair cells (Fig. 1). Cas9 expression was verified by RT-PCR from dissected organs of Corti (data not shown). Single intracochlear injection of an AAV vector containing a specific gRNA, targeting the exon 43 of *CACNA1D* gene, was performed at postnatal days P2-P4 in mice. These injected mice were named CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice (Fig. 1). The Cas9 endonuclease activity guided by this specific gRNA would generate hair cells without functional Cav1.3<sub>L</sub> C-terminal isoforms. The rate of hair cell transduction efficacy of the AAV-gRNA-eGFP, evaluated at P15-P30 by counting eGFP expressing hair cells under confocal fluorescent microscopy, indicated a high percentage of transduced IHCs (82.4%) and a lower percentage for OHCs (36.2 %).

### Decrease of auditory function in CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice

Measurements of auditory brainstem responses (ABRs) were performed to evaluate the auditory function of CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice at P17-P30 (Fig. 2A). These mice displayed a large increase in ABR thresholds as compared to control mice (Fig. 2A,B). All frequencies from 4 to 32 kHz were affected with a mean increase in threshold of 20-40 dB as compared to controls. Although the latency of ABR wave-I did not present any significant change, at least at low sound intensities, its peak amplitude was largely decreased in CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice (Fig. 2C,D). A normal wave-I latency in CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice suggested that the synaptic temporal response of the auditory ribbon synapses (firing synchrony of the nerve fibers) was unaffected (Fig. 2D). The decrease in wave-I amplitude could therefore be possibly explained by a decrease in transmitter release by IHCs.

Notably, the distortion product of otoacoustic emissions (DPOAEs), which probe the electromechanical activity of OHCs, remained unaffected in CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice (Fig. 2E). This auditory phenotype with abnormal ABRs and normal DPOAEs was indicative of an auditory hair cell synaptopathy, ie a defect in synaptic transmission between IHCs and the auditory nerve fibers. It is to be noted that a similar auditory phenotype was observed at older age in CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice, at 2-3 months of age (data not shown), suggesting that the hearing loss was not due to a developmental delay but was instead permanent.

### **CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> IHCs have Ca<sup>2+</sup> currents with a larger fast inactivation component**

The possible changes in Ca<sup>2+</sup> currents were investigated in IHCs from P15-P30 CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice using whole-cell patch-clamp recordings in *ex-vivo* organ of Corti preparations. This investigation was only performed in mice with high tone thresholds > 65 dB SPL, assuming that higher is the auditory threshold higher is the percentage of IHCs affected by the CRISPR-Cas9 process. All IHCs patch-clamp recordings were performed in the 20-40% normalized distance from the apex, area that encode sound frequencies ranging from 8 to 16 kHz.

Remarkably, IHCs from CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice displayed Ca<sup>2+</sup> currents (I<sub>Ca</sub>) with significant larger peak amplitudes as compared to wild-type sham-injected (control) mice (Fig 3A-3B). Furthermore, I<sub>Ca</sub> from IHCs of CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice also showed a significant larger fast inactivation component as compared to controls, 16.2 ± 1.5 % and 11.0 ± 1.3 %, respectively (Fig. 3A,C). The time constant of this fast inactivating component, determined by fitting the current decay with a single exponential function, was not significantly affected as compared to controls (Fig. 3D). The activation of these Ca<sup>2+</sup> currents from IHCs of CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice showed a similar voltage dependence as compared to controls (Fig. 3E). Indeed, when fitting the IV curves from -60 mV to -10 mV with a sigmoid Boltzmann function, there was no significant difference in the voltage giving half-maximal activation ( $v_{1/2} = -27.8 \pm 0.8$  mV and  $-31.9 \pm 0.7$  mV; in CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> and control IHCs;  $p = 0.24$ , unpaired-Student's t test). However, at -40 mV, a potential value close to the physiological resting membrane potential of IHCs (Dallos P, 1985), the amplitude of I<sub>Ca</sub> was significantly lower as compared to controls ( $18.1 \pm 6.0$  pA and  $33.2 \pm 4.4$  pA respectively;  $p = 0.045$ , unpaired-Student's t test). Furthermore, a significant positive-shift of about 6 mV in the voltage-dependent activation of the exocytotic responses was observed in IHCs of CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice (Fig 3F;  $p = 0.022$ ; two-way ANOVA).

### **Normal fast exocytosis of the RRP but abnormal low replenishment rate in vesicle during repetitive stimulations in IHCs of CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice**

Exocytosis of synaptic vesicles by IHCs was explored by monitoring the changes in membrane capacitance ( $\Delta C_m$ ) under whole cell patch-clamp recordings. Brief depolarization lasting from 5 to 40 ms (each from -80 to -10 mV) were applied to IHCs of CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice and control IHCs (Fig. 4A). This protocol, assessing the mobilization of the readily releasable pool (RRP) of vesicles at the active zone of IHCs, did not show any significant difference between CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> and control IHCs. However, when applying five

consecutive stimulations, the exocytosis of CRISPR-Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub> IHCs displayed a significant larger depression as compared to controls (Fig. 4B). This larger depression in CRISPR-Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub> IHCs was also observed when we used a larger train of stimulations (Fig 4C; two-way ANOVA  $p = 4.1 \cdot 10^{-8}$ ). These results suggested that the vesicular replenishment rate of the active zones of CRISPR-Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub> IHCs was severely impaired. The rate of recruitment, calculated for each cell by fitting the data with a linear function, was significantly diminished in CRISPR-Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub> IHCs as compared to control IHCs:  $39.1 \pm 14.7$  fF/sec and  $124.8 \pm 31.4$  fF/sec, respectively; Mann-Whitney test,  $p=0.033$ ).

## DISCUSSION

### *The long C-terminal isoforms of Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels are essential for hearing*

Among the large voltage-gated calcium channels gene family, auditory IHCs have specifically selected Cav1.3 L-type Ca<sup>2+</sup>-channels to trigger synaptic transmission at their ribbon synapses (see for review Pangrsic T et al., 2018). The long C-terminal variants of these channels (Cav1.3<sub>L</sub>) have a large C-terminal region that contains two regulatory domains (PCRD and DCRD) that slow down CaM-dependent inactivation. By using CRISPR-Cas9 technology, we have generated a novel mouse model that allowed us to study specifically the role of this C-terminal regulatory domain of Cav1.3<sub>L</sub> isoform in IHCs. Remarkably, CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice displayed an early severe hearing loss with normal otoacoustic emissions indicating a hair cell synaptopathy. These results suggested that the C-terminal regulatory domain of the Ca<sup>2+</sup> channels are essential for hearing. Surprisingly, the study of Scharinger et al. (2015) showed no hearing deficit in a mouse model expressing Cav1.3 channels (Cav1.3-DCRD<sup>HA/HA</sup>) with a truncated C-terminal regulatory. The different phenotype can be explained by the fact that this later study introduced an HA-antibody tag in the extreme C-terminal part of the regulatory domain, the DCRD domain, and on the contrary to our model conserved an intact PCRD domain. This PCRD domain appears therefore as essential for normal hearing.

### *Abnormal Ca<sup>2+</sup> currents in IHCs of CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice*

The assumption that our CRISPR-Cas9 strategy was truly targeting the *CACNA1D* gene was reinforced by recording Ca<sup>2+</sup> currents in IHCs. CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice showed larger Ca<sup>2+</sup> current amplitude and larger time inactivation, as well a slightly different voltage dependence, specially near resting membrane potential. In the mouse model Cav1.3-DCRD<sup>HA/HA</sup> of Scharinger et al. (2015), preserving the PCRD domain, the fast I<sub>Ca</sub> inactivation was, on the contrary to our study, reduced as compared to control mice. To explain this phenotype, the authors argued that a compensatory positive interaction of Ca<sup>2+</sup> binding proteins such as CaBPs may have reduced the fast inactivation in these DCRD truncated IHCs (Scharinger et al., 2015; Yang et al., 2006). Of note, while the peak current amplitude of Ca<sup>2+</sup> currents of Cav1.3-DCRD<sup>HA/HA</sup> IHCs were increased as in our model CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub>, the overall voltage dependent activation of the Ca<sup>2+</sup> currents was also essentially unchanged as in our study.

*Abnormal sustained exocytosis in IHCs of CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice*

CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> IHCs displayed normal Ca<sup>2+</sup>-evoked RRP exocytosis, reinforcing the hypothesis that the short C-terminal Cav1.3 isoforms, which display fast inactivation, are sufficient to trigger fast vesicular fusion (Vincent et al., 2017). The short isoforms of Cav1.3, lacking the PCRD and DCRD, would be important for high-frequency phase-locking and rapid adaptation of the firing rate of the auditory nerve fibers. Their fast inactivating properties would limit Ca<sup>2+</sup> diffusion and accumulation at the IHCs synaptic active zone.

Remarkably, CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> IHCs displayed faster exocytotic depression during repetitive stimulations indicating a deficit in vesicle recruitment to the active zone. These results are in good agreement with the study of Vincent et al. (2017) that impaired pharmacologically with nifedipine the Cav1.3<sub>L</sub> isoforms. Our present study confirms at the molecular level that the poorly inactivating Cav1.3<sub>L</sub> isoforms are essential for vesicular recruitment at the IHC active zone, presumably by allowing a deeper Ca<sup>2+</sup> diffusion and because vesicle recruitment, distant from the fusion sites, is also a Ca<sup>2+</sup>-dependent process (Spassova et al., 2004; Levic et al., 2011).

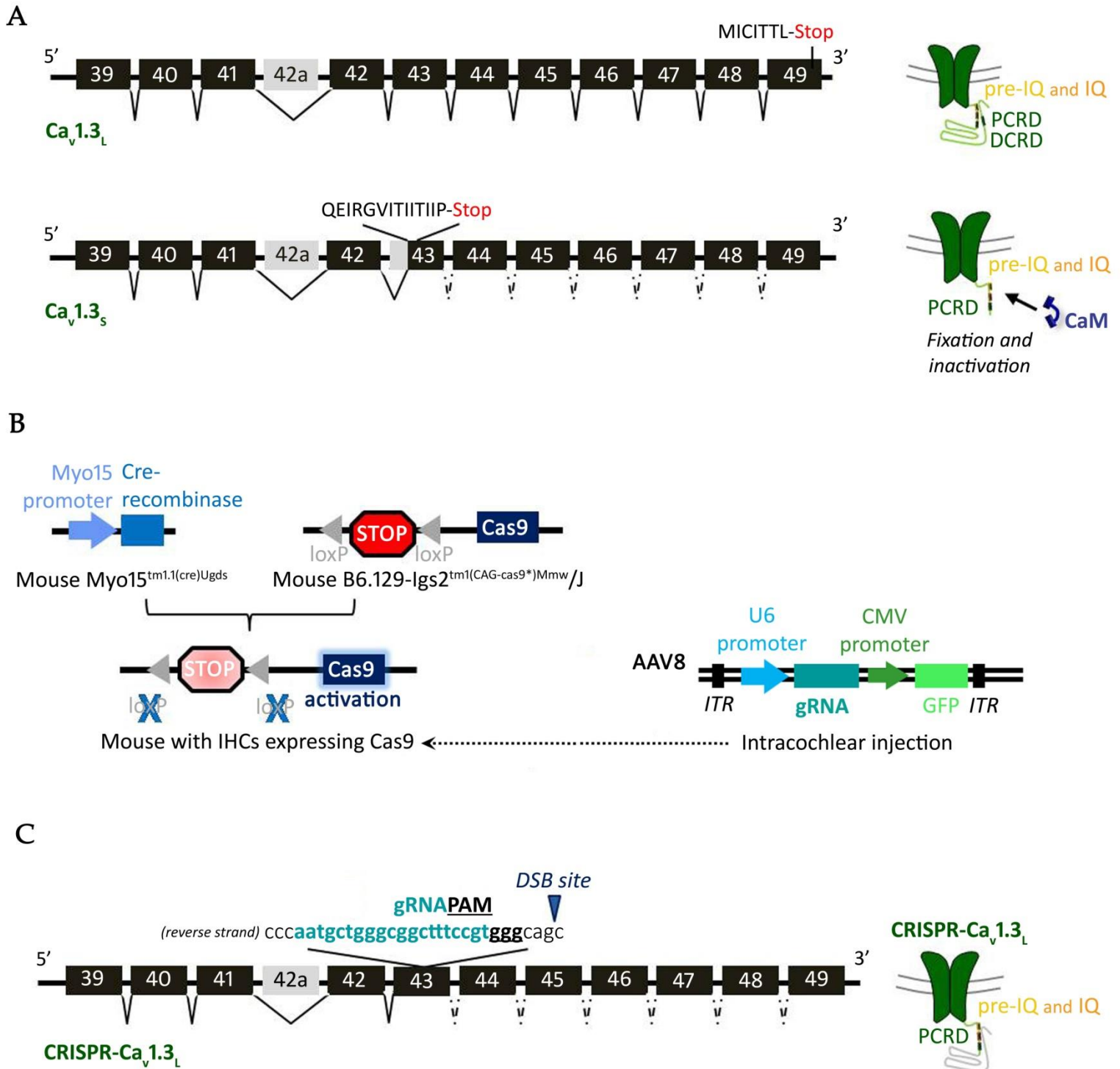
## REFERENCES

- 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 Ca(V)1.3 L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *JBC* 286:42736–42748.
- Brandt A, Striessnig J, Moser T. (2003) Cav1.3 Channels Are Essential for Development and Presynaptic Activity of Cochlear Inner Hair Cells. *J Neurosci.* 23:10832–40
- Brandt A, Khimich D, Moser T. (2005) Few CaV1.3 Channels Regulate the Exocytosis of a Synaptic Vesicle at the Hair Cell Ribbon Synapse. *J Neurosci.* 25:11577–85
- Caberlotto E, Michel V, Foucher I, Bahloul A, Goodyear RJ, Pepermans E, Michalski N, Perfettini I, Alegria-Prévot O, Chardenoux S, Do Cruzeiro M, Hardelin JP, Richardson GP, Avan P, Weil D, Petit C. (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 U S A.* 108:5825–30
- Catterall WA. (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:a003947
- Dallos P (1985) Membrane potential and response changes in mammalian cochlear hair cells during intracellular recording. *J Neurosci.* 1985 Jun;5(6):1609–15
- Dou H, Vazquez AE, Namkung Y, Chu H, Cardell EL, Nie L, Parson S, Shin HS, Yamoah EN. (2004) Null Mutation of  $\alpha 1D$  Ca<sup>2+</sup> Channel Gene Results in Deafness but No Vestibular Defect in Mice. *JARO* 5:215–226
- Dulon D, Papal S, Patni P, Cortese M, Vincent PF, Tertrais M, Emptoz A, Tlili A, Bouleau Y, Michel V, Delmaghani S, Aghaie A, Pepermans E, Alegria-Prevot O, Akil O, Lustig L, Avan P, Safieddine S, Petit C, El-Amraoui A. (2018) Clarin-1 gene transfer rescues auditory synaptopathy in model of Usher syndrome. *J Clin Invest.* 128:3382–3401
- Emptoz A, Michel V, Lelli A, Akil O, Boutet de Monvel J, Lahlou G, Meyer A, Dupont T, Nouaille S, Ey E, Franca de Barros F, Beraneck M, Dulon D, Hardelin JP, Lustig L, Avan P, Petit C, Safieddine S. (2017) Local gene therapy durably restores vestibular function in a mouse model of Usher syndrome type 1G *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 114:9695–9700
- 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 pre-association. *Neuron* 39: 97–107.
- 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.* 106:4483–8
- Huang H, Yu D, Soong TW. (2013) C-terminal alternative splicing of CaV1.3 channels distinctively modulates their dihydropyridine sensitivity. *Mol Pharmacol.* 84:643–53
- 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.*; 563:177–91
- 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
- Lindau M, Neher E (1988) Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflugers Arch.* 411(2):137–46.

- 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.
- 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.*; 97:883-8
- Pangrsic T, Singer JH, Koschak A. (2018) Voltage Gates Calcium Channels : Key players in sensory coding in the retina and the inner ear. *Physiol Rev.* 98:2063-2096
- 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.* 22:549-58
- 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 Ca<sup>2+</sup> Channels. *Cell.*; 102:89-97
- 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 U S A.*; 96:2435-8
- Scharinger A, Eckrich S, Vandael DH, Schönig 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 E3, Engel J, Striessnig J. (2015) Cell-type-specific tuning of Cav1.3 Ca<sup>2+</sup>-channels by a C-terminal automodulatory domain. *Front Cell Neurosci.* 9:309.
- 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.
- 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<sup>2+</sup> channels in heart and brain. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal.* 3:15-38
- 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
- Vincent PF, Bouleau Y, Charpentier G, Emptoz A, Safieddine S, Petit C, Dulon D. (2017) Different CaV1.3 Channel Isoforms Control Distinct Components of the Synaptic Vesicle Cycle in Auditory Inner Hair Cells. *J Neurosci.*, 37:2960-2975
- Yang P.S., Alseikhan B.A., Hiel H., Grant L., Mori M.X., Yang W., Fuchs P.A., Yue D.T. 2006. Switching of Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of Cav1.3 channels by calcium binding proteins of auditory hair cells. *J. Neurosci.* 26:10677–10689



FIGURES

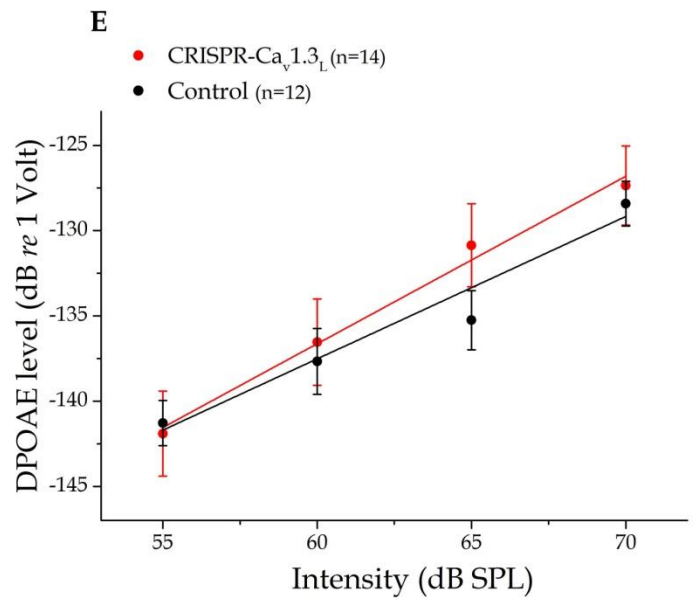
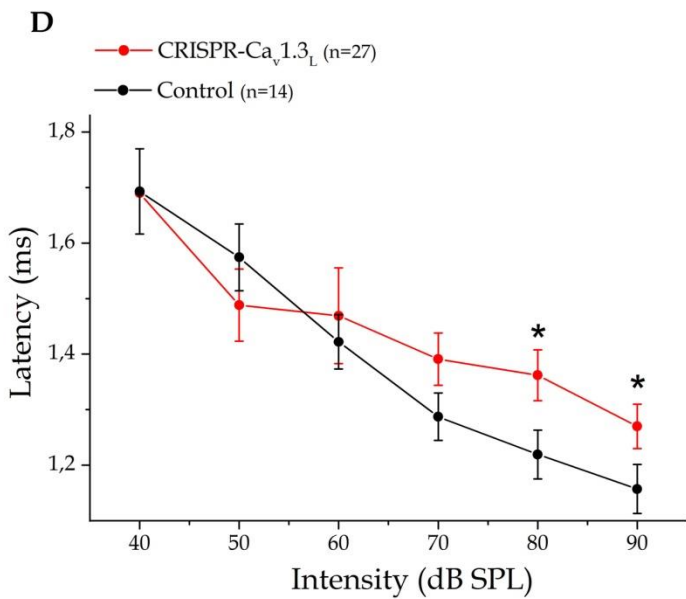
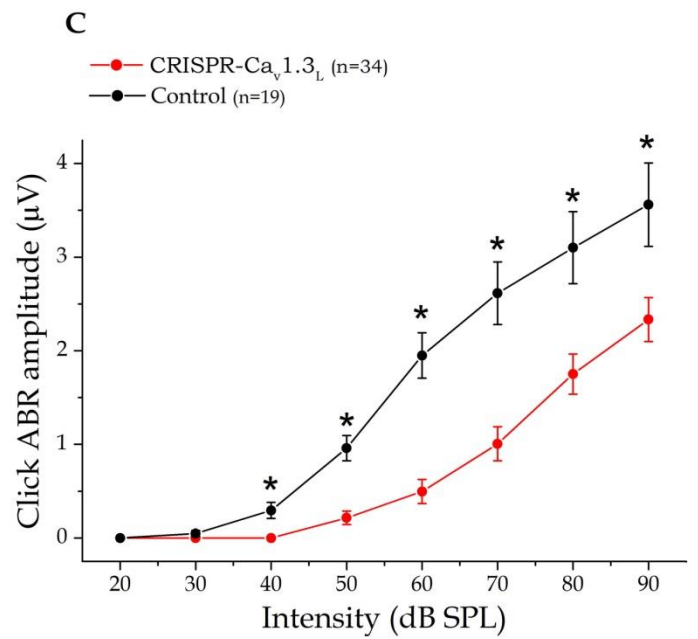
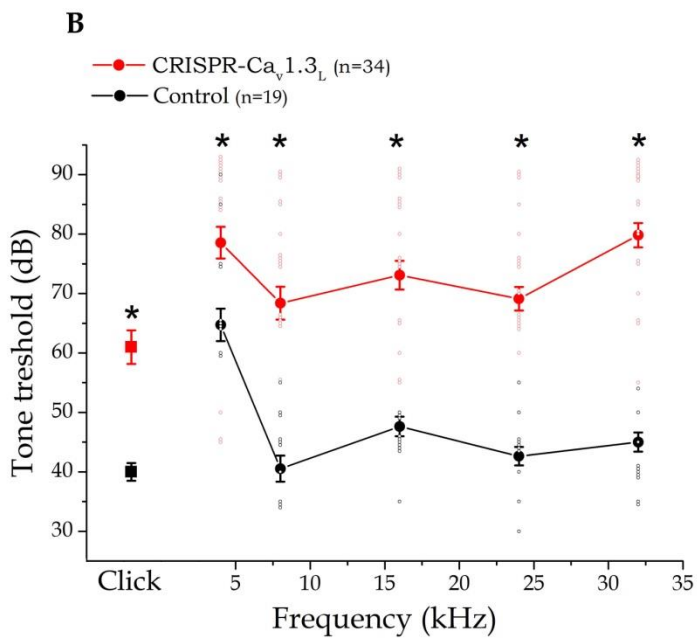
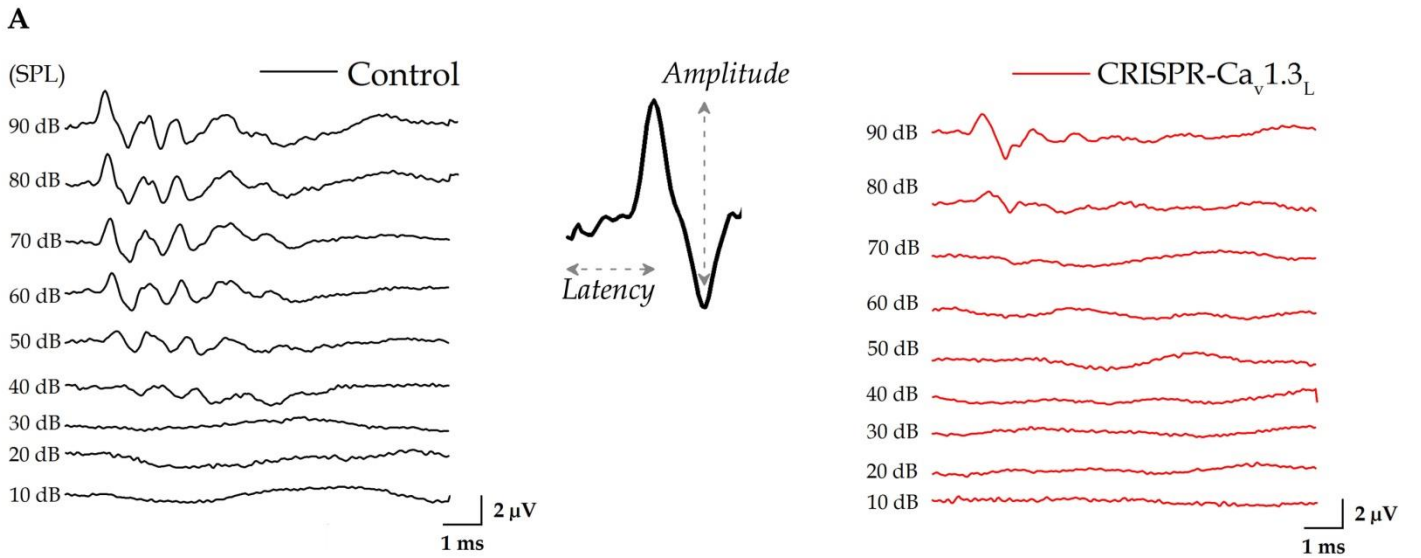


**Figure 1: CRISPR-Cas9 genome editing strategy to disrupt the long C-terminal part of Cav1.3<sub>L</sub> channel isoform.**

**A)** Schematic presentation of the alternative splicing in the C-terminal of Cav1.3 channels generating two Cav1.3 isoforms with different C-terminal lengths. Constitutive and alternative exons are shown as black and grey square, respectively. The schematic Cav1.3 is shown at right. The expression of exon 39 to 49 generates the full length Cav1.3 C-terminal called Cav1.3<sub>L</sub>. The alternative 3' splice acceptor site in exon 43 generates a truncated C-terminal part called Cav1.3<sub>S</sub> (which terminates in the amino acid sequence, QEIGVITITIIIP). Calmodulin (CaM) binds to the C-terminal part of the Cav1.3 channel, on the IQ and pre-IQ domains and produces a fast inactivation of the channel. In Cav1.3<sub>L</sub>, regulatory PCRD and DCRD domains compete with CaM and thus weaken the CaM-mediated fast inactivation.

**B)** Crossing Myo15<sup>tm1.1(cre)Ugds</sup> and B6.129-Igs2<sup>tm1(CAG-cas9\*)Mmw/J</sup> mice generated mice with IHCs expressing Cas9. Intracochlear injection of AAV vector containing a specific gRNA (targeting exon 43) was done at P2-P3.

**C)** The endonuclease Cas9 induces a double stranded break (DSB), which is repaired through non-homologous end joining (NHEJ), an error-prone process that produces insertions/deletions, and will conduct to the disruption on the target exon 43 without affecting Cav1.3<sub>S</sub> isoforms. The Cas9 edited *CACNA1D* gene then would lead to truncated forms of Cav1.3 channels which do not carry the long C-terminal regulatory part, named CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub>.



1 **Figure 2: CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice display severe deafness as indicated by higher auditory**  
2 **thresholds.**

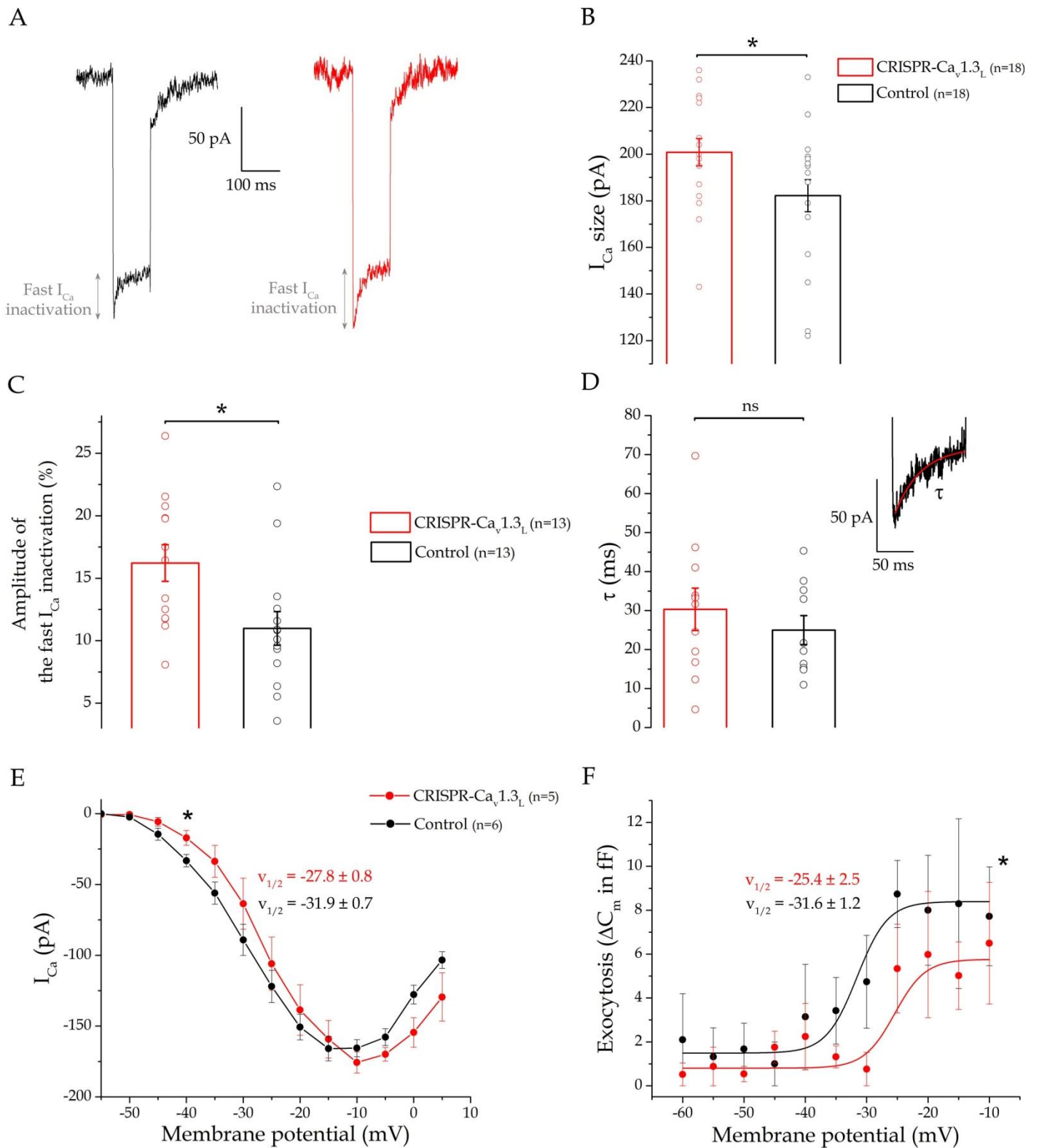
3 **A)** Comparative sound-evoked auditory brainstem responses (click-ABRs) at different  
4 intensities (dB SPL) in control (black - cochlear AAV-sham injected) and CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub>  
5 mice (red - cochlear AAV-gRNA-injected). ABRs were recorded in P17-P30 mice.

6 **B)** Click and tone ABR thresholds (from 4 to 32 kHz) are significantly increased in CRISPR-  
7 Cav1.3<sub>L</sub> mice as compared to control mice.

8 **C)** Click-evoked ABR amplitudes of wave-1 in CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice were significantly  
9 diminished between 40 and 90 dB SPL.

10 **D)** The latency of ABR wave-1 does not significantly change in CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice as  
11 compared to controls at low sound intensity, but was significantly increased at 80 and 90 dB  
12 SPL.

13 **E)** The distortion products of otoacoustic emissions (DPOAE) remain unaffected in CRISPR-  
14 Cav1.3<sub>L</sub> mice (\*p < 0.05).



15 **Figure 3: Abnormal Ca<sup>2+</sup> currents in CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> mice.**

16 **A)** Examples of Ca<sup>2+</sup> currents (I<sub>Ca</sub>) in control IHCs (black trace) and CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> IHCs  
17 (red trace) evoked by a 100 ms depolarizing step from -80 mV to -10 mV.

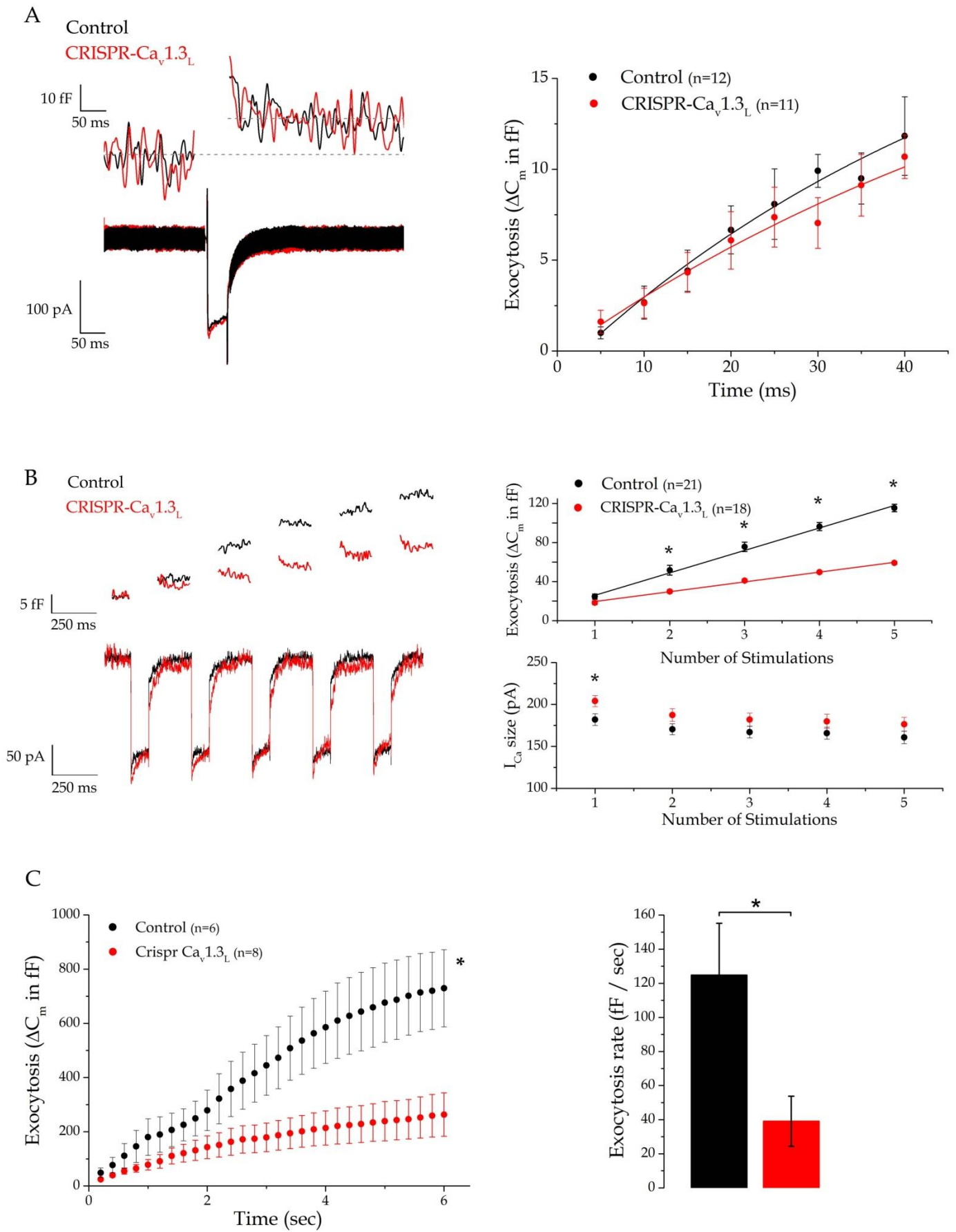
18 **B)** I<sub>Ca</sub> peak amplitudes are significantly increased in CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> IHCs as compared to  
19 controls (200.8 ± 5.8 pA and 182.2 ± 6.9 pA respectively; Student's t test, p=0.047).

20 **C)** The fast I<sub>Ca</sub> inactivation component is significantly larger in CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> IHCs as  
21 compared to controls (expressed in percent of peak amplitude; 16.2 ± 1.5 % and 11.0 ± 1.3 %  
22 respectively; p=0.014).

23 **D)** The inactivation time constant was fitted by a single exponential (see inset). The time  
24 constant (τ) in CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> IHCs (30.3 ± 5.4 ms) was not significantly different from  
25 control IHCs (25.0 ± 3.7 ms; Student's t test, p= 0.43).

26 **E)** Current-voltage activation curves of I<sub>Ca</sub> were fitted with a Boltzmann function from -55 to  
27 -10 mV to obtain the half-maximal voltage activation (V<sub>1/2</sub>). Two-way ANOVA analysis of  
28 the data indicated no significant difference (p = 0.21). However, at -40 mV only, we observed  
29 a significantly reduced I<sub>Ca</sub> in CRISPR-Cav1.3<sub>L</sub> IHCs as compared to control IHCs (18.1 ± 6.0  
30 pA and 33.2 ± 4.4 pA respectively; Student's t test, p= 0.045).

31 **F)** Exocytotic responses were plotted as a function of voltage and were fitted with a  
32 Boltzmann function. Data analysis with two-way ANOVA are significantly different  
33 (p=0.022). (In all graphs \* indicated p < 0.05).



34 **Figure 4: CRISPR-Cav1.3L IHCs display normal RRP exocytosis but with a strong**  
35 **defect in vesicle replenishment.**

36 **A)** Examples of vesicular exocytosis and  $\text{Ca}^{2+}$  currents triggered by 40 ms depolarizing step  
37 from -80 mV to -10 mV. At right, kinetics of RRP exocytosis is described during voltage-  
38 step depolarizations from -80 mV to -10 mV with duration increasing from 5 ms to 40 ms.  
39 Note that RRP exocytosis was not affected in CRISPR-Cav1.3L IHCs as compared to control  
40 IHCs (two-way ANOVA,  $p = 0.33$ ).

41 **B)** Stronger exocytosis depression in CRISPR-Cav1.3L IHCs as compared to control IHCs  
42 during five repeated stimulations of 100 ms (Student's t test, individual comparison at each  
43 pulse gave a significant difference with  $p < 0.05$ ).  $I_{\text{Ca}}$  was unchanged (except for the first  
44 stimulation;  $p < 0.05$ ).

45 **C)** To evaluate the replenishment of the active zone in vesicle, exocytosis was recorded  
46 during a train of 100 ms pulses from -80 mV to -10 mV in IHCs. In control IHCs, the  
47 exocytotic response displayed a linear behavior, indicative of an efficient vesicular  
48 recruitment. Note that in CRISPR-Cav1.3L IHCs, the vesicles recruitment is severely impaired  
49 (two-way ANOVA,  $p = 4.1 \cdot 10^{-8}$ ). The rate of exocytosis was obtained by fitting the data with  
50 a linear function. The rate of CRISPR-Cav1.3L IHCs was significantly reduced as compared  
51 as control IHCs (Mann-Whitney test,  $p = 0.034$ ). In all graphs, \* indicated  $p < 0.05$ ).



## **Investigations complémentaires sur l'article 3** : "*The use of CRISPR-Cas9 genome editing in vivo to probe the role of Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channel isoforms in synaptic transmission of mouse auditory hair cells*"

Afin de compléter notre étude concernant la différenciation des rôles des isoformes Ca<sub>v</sub>1.3<sub>S</sub> et Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub> à la synapse des CCI, différentes investigations sont en cours de réalisation. Trois expériences supplémentaires expliquées ci-dessous, intégreront cet article en préparation :

### 1. Séquençage de Nouvelle Génération (NGS)

Nous allons tout d'abord prouver la présence d'édérations géniques (indels) dans l'exon 43 du gène CACNA1D suite à l'action de l'enzyme Cas9. Pour cela, nous avons tout d'abord extrait l'ADN génomique de CCI issues de souris CRISPR-Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub>, dont les ABR présentaient un seuil élevé (> 65 dB), et de souris contrôles. Nous avons ensuite encadré le site de coupure de la Cas9 par des amorces spécifiques Illumina ([www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html](http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html)) afin d'amplifier puis de purifier ces régions qui seront séquencées par la technique de séquençage de nouvelle génération (NGS). Cette méthode nous permettra de caractériser les indels induisant l'interruption de traduction de l'exon 43 du gène CACNA1D. Nous allons également utiliser cette technique pour vérifier l'absence d'indels sur les trois séquences off-targets possibles identifiées. Ces expériences de NGS sont en cours, en collaboration avec la société Biofidal.

### 2. Immunohistochimie

La partie C-terminale régulatrice des canaux Ca<sub>v</sub>1.3 pourrait être indispensable à leur adressage à la membrane plasmique. En effet, nous pensons que les formes courtes Ca<sub>v</sub>1.3<sub>S</sub>, pourraient former des nanodomains calciques avec les vésicules du RRP tandis que les formes longues Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub> pourraient être situés au voisinage des ZA, formant des microdomaines (Vincent et al., 2014). Afin de vérifier cette hypothèse, nous allons effectuer un marquage immunohistochimique des rubans synaptiques et des canaux Ca<sub>v</sub>1.3 des CCI CRISPR-Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub> afin de caractériser les changements de leur distribution à la membrane plasmique par rapport à celle des CCI contrôles.

### 3. Imagerie calcique

Afin de compléter l'hypothèse de l'implication des isoformes Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub> dans la formation de microdomaines calciques autour du ruban, nous allons étudier et comparer la diffusion calcique intracellulaire entre les CCI CRISPR-Ca<sub>v</sub>1.3<sub>L</sub> et les CCI contrôles. Pour cela, nous allons effectuer des

expériences d'imagerie calcique *ex vivo* sur explants d'organes de Corti. Nous utiliserons l'indicateur calcique Rhod2, qui sera chargé dans la CCI par la technique de patch-clamp en configuration cellule-entière. Cette technique couplée à la microscopie confocale nous permettra de visualiser la montée calcique intracellulaire suivant la dépolarisation (Vincent et al., 2017). Lors de stimulations répétées, les CCI des souris contrôles présentent une élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  qui se propage depuis les ZA jusqu'aux zones extrasynaptiques (Schnee et al., 2011; Vincent et al., 2017). Concernant les CCI CRISPR- $\text{Ca}_v1.3_L$ , présentant une inactivation rapide plus importante que les CCI contrôles, nous nous attendons à une diffusion du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire plus faible et ralentie à partir des ZA. Un défaut de diffusion calcique intracellulaire en absence des  $\text{Ca}_v1.3_L$  pourrait expliquer le défaut de recrutement des vésicules synaptiques et par conséquent, la surdité des souris CRISPR- $\text{Ca}_v1.3_L$ .

# Discussion

## Chapitre I : Rôle de l'otoférline dans l'exocytose rapide et soutenue des CCI

La fusion soutenue des vésicules synaptiques s'effectue suite à leur réapprovisionnement efficace aux ZA. Les facteurs d'amorçage Munc13 ont été montrés comme étant essentiels à ce recrutement vésiculaire progressif dans les synapses centrales (Lipstein et al., 2013). Les synapses à rubans des CCI démontrent une activité de décharge de plusieurs centaines de Hz qu'elles peuvent soutenir indéfiniment tant que la stimulation acoustique est présente (Kiang 1965; Taberner and Liberman, 2005). Ces synapses possèdent donc un ravitaillement des ZA en vésicules synaptiques rapide et infatigable où les protéines Munc13 ne sont pas impliquées (Vogl et al., 2015).

C'est la protéine otoferline qui a été montrée comme étant indispensable au recrutement vésiculaire dans les synapses à ruban des CCI (Pangrsic et al., 2010). En effet, afin de déchiffrer le rôle de l'otoférline dans le cycle vésiculaire, plusieurs modèles de souris ont été développés. Cependant, les synapses des CCI chez les souris *Otof*<sup>-/-</sup> étant silencieuses (Roux et al., 2006), l'utilisation de ce modèle semble inadaptée pour étudier les différents rôles de l'otoférline et déterminer à quelles étapes du cycle vésiculaire, cette protéine joue un rôle. Le modèle murin *pachanga*, présentant une surdité suite à la présence d'une mutation non-sens sur le domaine C2-F de l'otoférline, montre une exocytose des vésicules du RRP inchangée mais une diminution importante de la composante soutenue de l'exocytose (Pangrsic et al., 2010). Cette étape altérée du ravitaillement vésiculaire aux ZA, amène les auteurs à suggérer le rôle de l'otoférline dans ce mécanisme, excluant sa possible fonction dans la fusion rapide des vésicules. Cependant, dans ce modèle *pachanga*, le taux d'expression de l'otoférline est largement diminué (-70%) comparé au niveau des souris sauvages, ceci étant probablement dû à la dégradation plus rapide de l'otoférline mutée. De la même façon, une étude sur un modèle murin portant une mutation thermosensible sur le domaine C2-C (*Otof*<sup>I515/I515</sup>) de l'otoférline montre une perturbation de l'exocytose soutenue, mais le niveau d'expression total d'otoférline est également fortement réduit (-65%) (Strenzke et al., 2016).

Notre équipe a alors choisi de modifier génétiquement les propriétés de liaison du Ca<sup>2+</sup> sur le domaine C2-C de l'otoférline en substituant deux résidus aspartates du site de fixation du Ca<sup>2+</sup>, en deux résidus alanines (Michalski et al., 2017). Cette technique de mutagenèse avait déjà été utilisée dans la démonstration de Syt1 et Syt2 comme senseurs calciques dans les synapses du SNC (Fernandez-Chacon et al., 2001). Contrairement aux modèles murins sur l'otoférline cités précédemment, ce modèle *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> créé, permet de préserver à la fois le taux et la distribution de la protéine ainsi que l'ultrastructure des synapses des CCI de façon similaire aux souris sauvages. Nous montrons que les souris *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> présentent une sensibilité calcique affectée se traduisant par une diminution de l'exocytose des vésicules formant le RRP mais aussi par un défaut du ravitaillement vésiculaire. Cette étude nous permet donc de proposer l'implication de l'otoférline en tant que senseur

calcique à la fois dans le ravitaillement des vésicules synaptiques mais également dans leur fusion rapide aux ZA des CCI (Michalski et al., 2017).

Le modèle murin *Otof*<sup>C2C/C2C</sup> nous a donc permis d'établir le rôle essentiel de l'otoférline dans le cycle vésiculaire, toutefois les mécanismes moléculaires de fonctionnement de cette grande protéine à six domaines C2 restent encore à élucider. Pourquoi les synapses des CCI requièrent-elles un senseur calcique avec six domaines C2 alors que les synapses centrales utilisent les synaptotagmines qui n'en possèdent que deux ? Tous les domaines C2 sont-ils indispensables à l'exocytose des vésicules synaptiques ? Afin de tenter de répondre à ces questions et de disséquer le rôle des différents domaines C2, nous avons permis l'expression de formes raccourcies de l'otoférline dans les CCI de souris *Otof*<sup>-/-</sup>.

## Chapitre II : Rôle des domaines C2 de l'otoferline dans l'exocytose des CCI

### A) Mini-Otoferlines

Nous avons choisi d'utiliser quatre constructions raccourcies de l'otoferline comprenant soit les domaines C2-EF, C2-DEF, C2-ACEF ou C2-ACDF avec le domaine transmembranaire (TM) en C-terminal. Ces formes raccourcies (mini-Otof) ont été insérées dans un vecteur AAV8 et injectées dans la fenêtre ronde de la cochlée de souris *Otof*<sup>-/-</sup> afin de caractériser les possibles restaurations du phénotype auditif ou cellulaire. Nous avons choisi d'utiliser les vecteurs AAV pour leur non-pathogénicité, leur capacité à fournir une expression du transgène (ici, les mini-Otof) à long terme dans les tissus post-mitotiques, en l'absence de leur intégration dans le génome.

Bien que la mesure des ABR n'ait pas permis de visualiser une amélioration des seuils auditifs des souris *Otof*<sup>-/-</sup> injectées avec chacune des mini-otoferlines citées, cette méthode n'est pas assez précise dans la détection de changements subtiles de la fonction auditive; par exemple, ceux associés à certaines synaptopathies produites par le vieillissement ou l'exposition au bruit, qui sont ainsi classées comme "pertes auditives cachées" (pour revue, voir : Liberman, 2017). Il était donc possible qu'une récupération synaptique après les injections de mini-Otof chez les souris *Otof*<sup>-/-</sup> ne puisse pas être détectée dans les enregistrements ABR. C'est pourquoi nous avons également exploré une récupération éventuelle de la fonction synaptique directement au niveau des CCI par la technique du patch-clamp.

#### a) C2-EF

La mini-otoferline, comprenant uniquement le domaine TM et les deux derniers domaines en C-terminal qui lui sont adjacents (C2-EF), a une structure analogue à celle des synaptotagmines qui possèdent deux domaines C2 (C2-A et C2-B) en plus de leur domaine TM. D'autre part, ce motif C2-EF a été montré comme pouvant être le résultat d'un clivage par la calpaïne (Redpath et al., 2014). En effet, cette protéase est également à l'origine de la mini-dysferline-C72 (correspondant aux domaines C2-EF et au domaine TM de la dysferline), recrutée aux sites de lésions membranaires de myocytes et permettant leur réparation en fusionnant les membranes plasmiques et vésiculaires (Lek et al., 2013). Nous avons alors fait l'hypothèse qu'une mini-otoferline semblable à cette mini-dysferline pourrait, de la même façon, aider à la fusion entre les membranes plasmiques et vésiculaires, lors de l'augmentation calcique aux zones actives suivant la dépolarisation. Nos résultats indiquent que l'expression de cette mini-otoferline C2-EF permet une restauration partielle de la fusion des vésicules synaptiques du RRP à la membrane plasmique.

b) C2-DEF

Nous avons ensuite tenté de restaurer l'exocytose des CCI *Otof*<sup>-/-</sup> en exprimant l'équivalent de l'isoforme courte de l'otoferline retrouvée chez l'homme (Yasunaga et al. 1999; 2000), comprenant les domaines C2-DEF. Le domaine C2-D pouvant se lier au canal calcique Ca<sub>v</sub>1.3 *via* sa boucle cytoplasmique II-III (Ramakrishnan et al., 2009), nous nous attendions à une efficacité calcique de l'exocytose améliorée par rapport aux domaines C2-EF seuls. Cependant, nos résultats indiquent que l'ajout du domaine C2-D n'améliore pas de façon significative l'exocytose vésiculaire, celle-ci ayant lieu en présence des domaines C2-EF uniquement. Il est à noter que la mini-Otof C2-DEF, ne contient pas le domaine FerA, un domaine unique à la famille des ferlines. Il se pourrait alors que le domaine FerA soit indispensable à une fusion vésiculaire efficace. En effet, il a très récemment été montré que les domaines FerA et FerB des ferlines ne formeraient qu'un seul domaine fonctionnel (renommé FerA) à quatre hélices  $\alpha$ , dont le Ca<sup>2+</sup> potentialise l'interaction avec les phospholipides membranaires (Harsini et al., 2018). Les auteurs proposent alors que les hélices  $\alpha$  du domaine FerA puissent jouer le rôle de v- et t-SNAREs. Ainsi les ferlines seraient à la fois senseur calcique de par leurs domaines C2 et SNAREs *via* le domaine FerA. Cet argument se base principalement sur la présence d'une arginine située au centre des quatre hélices, de façon similaire aux protéines SNAREs. Cependant l'otoferline est l'unique ferline à ne pas posséder cet acide aminé, remettant en cause cette hypothèse concernant l'otoferline et la machinerie synaptique des CCI. L'explication des auteurs serait alors que le domaine FerA, suite à son insertion dans la membrane plasmique, induirait une courbure de l'otoferline, catalysant ainsi la fusion entre les membranes plasmiques et vésiculaires (Harsini et al., 2018). L'absence du domaine FerA pourrait donc expliquer la restauration seulement partielle de l'exocytose du RRP lors de l'expression des mini-Otof C2-DEF dans les CCI.

c) C2-ACEF et C2-ACDF

Lors de la construction des deux mini-Otof à quatre domaines C2 (C2-ACEF et C2-ACDF), différents facteurs ont été pris en compte afin de générer une otoferline compacte mais conservant un maximum de ses propriétés, comme la présence des domaines C2 situés aux extrémités N- et C-terminal (soit le C2-A et le C2-F) et du domaine FerA. Cette construction de ferline raccourcie à quatre domaines C2 a été précédemment réalisée pour la dysferline (appelée nano-dysferline) et avait permis la restauration des fonctions motrices musculaires d'un modèle murin déficient pour la dysferline (Llanga et al., 2017).

Concernant la mini-Otof C2-ACEF, de façon similaire, nous attendions une restauration de la transmission synaptique des CCI, ou du moins son amélioration, suite l'ajout des domaines C2-A et C2-C à la première mini-Otof testée : C2-EF. Nos résultats ont confirmé cette dernière hypothèse puisque l'expression de la mini-Otof C2-ACEF conduit à une exocytose plus efficace des vésicules du

RRP. De par sa construction plus grande se rapprochant de la forme entière, des interactions potentielles entre cette mini-Otof C2-ACEF et les SNAREs syntaxine-1A, SNAP-25 ainsi que les canaux calciques  $Ca_v1.3$  ont pu s'ajouter, permettant une exocytose des vésicules du RRP plus efficace. Cependant, ces mini-Otof C2-EF, C2-DEF et C2-ACEF restent des formes tronquées et ne sont pas suffisantes pour rétablir un recrutement normal soutenu des vésicules aux ZA des CCI, expliquant l'absence de recouvrement des potentiels auditifs évoqués (ABR).

De façon surprenante, la mini-Otof C2-ACDF construite de la même façon que la mini-Otof C2-ACEF, ne permet qu'un faible rétablissement de la fusion vésiculaire des CCI. Nous en avons déduit l'importance du module C2-EF en C-terminal, ces deux domaines C2 étant les plus conservés dans l'évolution dans la famille des ferlines (Lek et al., 2010).

La forme complète à six domaines C2 semble donc être indispensable à la fois pour la fusion rapide des vésicules mais également pour leur recrutement. Nous pensons que la forme complète permet à l'otoferline de multiplier ses liaisons de façon simultanée à la fois aux canaux calciques et aux protéines SNAREs comme cela a été suggéré dans une étude récente sur les domaines C2 (Hams et al., 2017). De plus, la forme complète favorise les interactions entre domaines C2 qui pourraient alors former une structure tertiaire « fermée » à faible concentration calcique, qui s'ouvrirait lors de l'augmentation calcique suivant la dépolarisation cellulaire comme cela a été proposé par Ramakrishnan et al. (2014). Ces états fermés et ouverts des senseurs calciques ont également été proposés pour les domaines C2-A et C2-B des synaptotagmines (Fuson et al., 2007 ; Evans et al., 2016).

#### d) Préservation des rubans synaptiques

Nous avons également caractérisé le nombre de rubans présents à la membrane plasmique des CCI. En effet, Vincent et al., (2017) montrait une diminution de ces derniers chez les souris *Otof*<sup>-/-</sup>. Nos résultats montrent que l'expression des mini-Otof C2-EF et C2-ACEF ont toutes deux permis la préservation partielle du nombre de rubans présents à la membrane des CCI.

Sachant que le succès de l'implant cochléaire dépend essentiellement de la survie des fibres nerveuses du nerf auditif, il serait intéressant d'envisager un couplage entre implantation et injection de mini-Otof chez les patients DFNB9. L'expression des mini-Otof pourrait alors permettre de préserver à long terme les rubans synaptiques des CCI, essentiels au maintien des fibres nerveuses. Les facteurs trophiques comme la neurotrophine-3 (NT-3) et le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) sont des neurotrophines critiques dans le développement et la fonction du système nerveux auditif (Pirvola et al., 1992). Leur injection virale pourrait également être envisagée afin de potentialiser les effets de l'implant cochléaire. En effet, une étude a montré que l'expression de ces deux facteurs trophiques, par voie virale (AAV), permet d'augmenter la survie et de restaurer la



croissance des fibres auditives afférentes chez des modèles de surdité (kanamycine et furosemide) chez le cobaye (Budenz et al., 2015).

## **B) Rôle de l'otoferline dans l'inactivation rapide du courant calcique**

L'absence d'otoferline dans les CCI est associée à l'absence de la composante rapide de l'inactivation du courant  $Ca^{2+}$  et à une diminution de l'expression des canaux  $Ca_v1.3_S$  (Vincent et al., 2017). Ces résultats suggèrent donc l'existence d'une interaction fonctionnelle entre l'otoferline et les isoformes courtes  $Ca_v1.3_S$ , responsables de cette inactivation rapide. Des interactions directes entre la boucle cytoplasmique II-III des canaux  $Ca_v1.3$  et l'otoferline *via* son domaine C2-D ou ses domaines C2-ABDF ont été suggérées *in vitro* (Ramakrishnan et al., 2009; Hams et al., 2017). Nos résultats démontrent que l'expression des mini-Otof C2-DEF dans les CCI *Otof*<sup>-/-</sup> permet de conserver significativement l'inactivation rapide du courant calcique. Cependant, les mini-Otof C2-EF et C2-ACEF ne suscitent aucune restauration de ce pic d'inactivation. Nous pensons donc que le domaine C2-D de l'otoferline est nécessaire à son interaction directe ou indirecte avec les canaux calciques. Il se pourrait également que la petite interruption de séquence présente entre les domaines C2-E et C2-F dans la construction de la mini-Otof C2-ACEF (1695aaΔ1731aa) entraîne une altération de la structure tridimensionnelle de la partie C-terminale de l'otoferline, empêchant son interaction avec les canaux calciques. Ces résultats renforcent donc la perspective d'une interaction possible entre les isoformes courtes  $Ca_v1.3_S$  et la partie C-terminale de l'otoferline.

L'étude de Hams et al. (2017) propose que l'otoferline pourrait en fait interagir avec 4 canaux  $Ca_v1.3$  de façon simultanée, ainsi qu'avec 4 protéines SNAREs, formant alors un complexe d'hétéro-oligomères. La liaison de l'otoferline avec la vésicule synaptique, le canal calcique et les protéines de fusion membranaire dans une certaine proximité spatiale augmenterait la fidélité et la précision de l'exocytose en réponse à l'influx calcique présynaptique (Hams et al., 2017).

## **C) Mise en évidence d'une endocytose ultra-rapide dépendante de la dynamine et de l'otoferline**

Les vitesses très importantes d'exocytose des CCI doivent être compensées par une endocytose tout aussi rapide et efficace. Cependant, les modes d'endocytose décrits jusqu'à présent dans les CCI ne paraissent pas suffisamment rapides pour maintenir l'homéostasie membranaire (Beutner et al., 2001; Jung et al., 2015). Nous avons alors mesuré la variation de capacité membranaire ( $\Delta C_m$ ) suite à des dépolarisations très brèves, de l'ordre de 20 ms. Ces dépolarisations ont été

effectuées en absence puis en présence d'un inhibiteur puissant de la dynamine. En effet, la dynamine, une protéine se polymérisant autour du cou de la vésicule et la séparant de la membrane plasmique, a été montrée comme essentielle au mode d'endocytose qualifiée d'ultra-rapide dans les neurones de l'hippocampe (Watanabe et al., 2013). Nous avons donc exploré la possible implication d'un tel processus d'endocytose ultra-rapide dans les CCI.

#### a) Dynamine-dépendance

L'expression de la dynamine a été trouvée enrichie à la zone péri-active des synapses à rubans des photorécepteurs de la rétine (Wahl et al., 2013). Par techniques d'immunomarquages l'étude montre que la dynamine est présente de façon discrète dans les synapses mais se trouve particulièrement enrichie autour des rubans que les auteurs ont marqué par des Ac contre les protéines ribeye et bassoon. Des analyses quantitatives indiquent la présence de dynamine à environ 125 nm de ribeye (Wahl et al., 2013). Une étude a précisé ultérieurement qu'il s'agirait de l'isoforme courte en C-terminal de la dynamine, nommée dynamine-1xb (Eich et al., 2017). Concernant les synapses à rubans des CCI, l'étude de Neef et al., (2014) a confirmé par immunohistochimie la présence intracellulaire de dynamine.

En l'absence puis en présence de l'inhibiteur de la dynamine (Dyngo-4a), nous avons alors testé la mobilisation des vésicules du RRP en dépolarisant les CCI par de brèves stimulations de 20 ms. De façon remarquable, la présence de l'inhibiteur de dynamine a provoqué une augmentation de la réponse de la capacité membranaire. Les réponses  $\Delta C_m$  enregistrées résultent de la différence nette entre exo- et endocytose, donc l'effet croissant du Dyngo-4a sur la réponse  $\Delta C_m$  suggère qu'il a inhibé une endocytose dans une échelle de 20 ms, échelle en accord avec l'endocytose ultra-rapide décrite dans les synapses centrales (Watanabe et al., 2013).

Il est important de souligner que le courant calcique ne varie pas en présence du Dyngo-4a, écartant ainsi la possibilité d'une augmentation de l'exocytose suite à une augmentation de l'influx calcique. De plus, le Dyngo-4a n'a eu aucun effet de potentialisation sur la réponse résiduelle de  $\Delta C_m$  des CCI *Otof*<sup>-/-</sup>. Nous pouvons alors en déduire soit que la réponse d'exocytose des CCI déficientes en otoferline est trop faible pour démasquer une endocytose ultra-rapide, soit que l'otoférline est requise pour ce mode d'endocytose ultra-rapide. L'otoférline pourrait alors avoir une fonction de senseur calcique à la fois pour l'exocytose et pour l'endocytose, comme il l'a été suggéré pour la synaptotagmine 1 (Poskaner et al., 2003; Yao et al., 2012).

Nous avons ensuite testé l'effet du Dyngo-4a sur la réponse  $\Delta C_m$  évoquée par libération de  $Ca^{2+}$  piégé. La réponse  $\Delta C_m$  bien plus élevée en présence de l'inhibiteur de dynamine suggère une nouvelle fois qu'une endocytose a lieu simultanément avec l'exocytose. Les CCI *Otof*<sup>-/-</sup> présentent une réponse  $\Delta C_m$  résiduelle mais le Dyngo-4a ne provoque toujours pas de changement de l'exocytose mesurée en absence d'otoférline. L'expression des mini-Otof C2-EF, C2-DEF et C2-ACEF, nous ont

alors permis de démasquer et de mesurer une endocytose ultra-rapide juste après la libération du  $\text{Ca}^{2+}$ . Nous pensons que ce phénomène a également lieu dans les CCI WT, seulement, l'exocytose déclenchée par la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  est tellement importante qu'elle couvre toute endocytose ayant lieu simultanément. Les mini-Otof constituent donc un outil intéressant pour mettre en évidence et mesurer une endocytose ultra-rapide ayant lieu de façon concomitante avec l'exocytose. Comment l'exocytose et l'endocytose se déclenchent-elles de façon interdépendante et compensatoire ? On sait que l'endocytose peut être activée à une faible concentration calcique. Cependant elle se trouve inhibée lorsque celle-ci dépasse 900 nM, concentration pour laquelle l'exocytose a toujours lieu, comme il l'a été montré aux terminaisons synaptiques des neurones bipolaires par von Gersdorff et Matthews (1994a et 1994b). Lors d'une stimulation des CCI, l'exocytose des vésicules synaptiques se déclencherait instantanément ( $< \text{ms}$ ) suite à l'activation voltage-dépendante des canaux  $\text{Ca}_v1.3$  et l'endocytose ultra-rapide pourrait alors se déclencher suite à la baisse de la concentration calcique résultante de l'inactivation des canaux ( $> \text{ms}$ ).

Une étude précédente a également testé l'effet du Dyno-4a sur l'endocytose des CCI en mesurant le temps de retour de la capacité membranaire à sa valeur initiale après stimulation (Neef et al., 2014). Les auteurs ont observé un temps d'endocytose ralenti en présence de l'inhibiteur de dynamine, illustrant aussi l'implication de cette dernière dans l'endocytose lente (10-20 s).

#### b) Actine-F

L'endocytose ultra-rapide a été caractérisée dans les synapses de l'hippocampe comme étant dynamine-dépendante mais également dépendante de l'actine-F, qui permettrait d'initier la courbure de la membrane plasmique (Watanabe et al., 2013). En effet, sous l'action d'un inhibiteur de l'actine, la latrunculine-A, la polymérisation d'actine est perturbée et aucune endocytose ultra-rapide n'est visualisée (Watanabe et al., 2013). Il a été montré que la perturbation du réseau d'actine au niveau des synapses à rubans des CCI, par action de la latrunculine-A, augmente le taux apparent d'exocytose (Vincent et al., 2015 ; Guillet et al., 2016). L'étude de Guillet et al., 2016 mesure cette augmentation de la réponse de  $\Delta C_m$  après une stimulation très brève de 20 ms mais celle-ci disparaît pour une stimulation de 50 ms. Les auteurs avaient alors conclu qu'en présence de latrunculine-A, un nombre plus important de vésicules avait fusionné à la membrane, suggérant que l'actine permettrait de réguler un pool de vésicules qui se situerait entre le RRP et le ravitaillement vésiculaire (Guillet et al., 2016). L'étude de notre laboratoire (Vincent et al., 2015) avait émis l'hypothèse que le réseau d'actine, en plus d'organiser les microdomaines calciques, agissait également en tant que barrière de diffusion pour les vésicules synaptiques, limitant alors leur accès aux sites de fusion comme il l'avait déjà été suggéré dans certaines synapses centrales (Cingolani and Goda, 2008). Nous pensons actuellement que l'augmentation de l'exocytose produite par la latrunculine-A, pourrait en fait être due à la perturbation

de l'endocytose ultra-rapide, entraînant donc un effet positif apparent sur l'exocytose mesurée après une stimulation de 20 ms, de façon similaire à l'effet observé avec le Dyngo-4a.

### c) Endocytose ultra-rapide des synapses centrales

Les invaginations membranaires de l'endocytose ultra-rapide décrites dans les synapses de l'hippocampe ont été observées flanquant la zone active (située à ~ 200 nm des sites de fusion) plutôt qu'au milieu de celle-ci, ce qui distingue cette voie endocytotique du "kiss-and-run" (Watanabe et al., 2013 ; voir revue Watanabe et Boucrot, 2017). De plus, la surface des invaginations de l'endocytose ultra-rapide équivaut à environ quatre vésicules synaptiques et non à une seule vésicule. Ainsi, ce ne serait pas la récupération intacte de la membrane des vésicules venant juste de fusionner, mais une récupération de membrane plasmique permettant de maintenir une tension et une surface membranaire stable et intacte. Dans la membrane des ZA des CCI, en dessous des rubans, les canaux  $Ca_v1.3$  ont la particularité d'être concentrés et disposés en 3 ou 4 rangées parallèles formant des bandes (ou "strips") (Roberts et al., 1990; Wong et al., 2014; Vincent et al., 2014; Vincent et al., 2018) autour desquelles, à distance nanométrique, gravitent les vésicules synaptiques prêtes à fusionner. Compte-tenu des constantes de temps de l'endocytose ultra-rapide que nous avons mesurées (~10 ms), il est fort probable que le retrait membranaire (endocytose) dans les CCI se fasse à très proche distance des sites de fusion. Des investigations futures par des techniques de "flash and freeze" permettraient de confirmer ces hypothèses, donc de savoir si l'endocytose ultra-rapide des CCI se produit aux abords proches des ZA, de façon semblable aux synapses hippocampiques.

Il a été montré que les deux domaines C2 de la synaptotagmine 1, un des senseurs calciques principaux des synapses centrales, pouvaient accélérer l'endocytose, même si le domaine C2-A (contrairement au C2-B) ne se lie pas directement à la protéine adaptatrice AP-2 (Zhang et al., 1994; Yao et al., 2012). Les auteurs concluent que la synaptotagmine 1 fonctionne comme un double senseur calcique durant l'exocytose et l'endocytose dans les neurones de l'hippocampe (Yao et al., 2012). Nous proposons donc que l'otoférline joue également ce double rôle et aide ainsi à coupler ces deux mécanismes afin de maintenir un équilibre dans le cycle des vésicules synaptiques des CCI.

## Chapitre III : Perspectives de thérapie génique de l'oreille interne

### A) Utilisation d'autres vecteurs

Pour notre étude d'expression de mini-otoferlines dans les souris *Otof*<sup>-/-</sup>, nous devons utiliser des vecteurs capables de cibler principalement les CCI, c'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser l'AAV8 (Emptoz et al., 2017; Dulon et al., 2018). Cependant des études, pointant la difficulté d'infecter les CCI mais également les CCE, ont développé *in silico* l'Anc80, un AAV se rapprochant de l'état ancestral de la capsid de la majorité des AAV (Zinn et al., 2015; Landegger et al., 2017; Suzuki et al., 2017). Cet AAV synthétique est capable d'infecter 80-90% des cellules ciliées de la cochlée mais également du vestibule, permettant la restauration de l'audition chez un modèle murin du type 1C du syndrome de Usher, touchant la protéine harmonine (Pan et al., 2017). Cependant, bien que les AAV conventionnels aient un bon profil d'innocuité, l'Anc80 n'a pas encore été évalué chez l'Homme et nécessitera des examens minutieux (Pan et al., 2017).

Une étude de György et al., (2016) a démontré que l'association d'un AAV avec un exosome serait également un transporteur potentiel puisque qu'un exo-AAV1 possède une transfection plus efficace des CCI et CCE que l'AAV1 seul. L'exo-AAV1 permet également une restauration partielle de l'audition chez un modèle murin de la surdité humaine due à un défaut des stéréocils, nommée *Lhfp15/Tmhs*<sup>-/-</sup>.

### B) Propriétés de concatémérisation des AAV

L'encapsidation maximale de 5 kb des AAV reste une limite dans la thérapie des surdités liées à une mutation sur un gène long, comme celui de l'otoferline. La voie de thérapie génique afin de restaurer le phénotype auditif DFNB9 consistera peut-être en l'utilisation de deux AAV complémentaires, contenant chacun la moitié de l'otoferline et permettant son expression complète. En effet la capacité inhérente des génomes d'AAV à subir une concatémérisation intermoléculaire (Duan et al, 1998) peut être exploitée pour transférer de grands gènes comme celui de l'otoferline, *in vivo*, en scindant le gène dans deux cassettes (< 5 kb), chacune contenue dans l'un des deux vecteurs AAV séparés. Cette méthode de double-AAV est actuellement testée sur l'otoferline par les équipes du Pr Petit (Emptoz et al., 2016, Manuscrit de thèse) et du Dr Reisinger (Al-Moyed et al., 2018, ARO San Diego). Le premier vecteur contient le promoteur, la partie 5' de l'ADNc de l'otoferline associée à une séquence intronique portant un site d'épissage donneur et le second vecteur contient une séquence intronique avec un site d'épissage accepteur suivi de la partie 3' de l'ADNc de l'otoferline et du site polyA (Trapani et al., 2014 ; pour revue voir : Chamberlain et al., 2016). Sous la co-infection de la même cellule par les deux vecteurs, les ITR s'hybrident, les séquences introniques sont épissées pour

alors obtenir un ARNm mature et une protéine otoferline entière. Ces études montrent une expression de la forme entière de l'otoferline dans les CCI. Cependant, de façon surprenante, la restauration à la fois de l'audition (seuils ABR) et du niveau d'exocytose rapide et soutenu des CCI n'est que partielle.

Cette technique de double-AAV avait été préalablement utilisée avec succès dans l'expression de grands gènes dans les muscles et la rétine (Reich et al., 2003 ; Lai et al., 2005) ainsi qu'avec la dysferline (Lostal et al., 2010) dans le cadre de dysferlinopathie, engendrant une dystrophie musculaire. Bien que le taux d'expression de dysferline fonctionnelle exprimée grâce au concatémères d'AAV reste faible (1-4%), il reste suffisant pour diminuer les symptômes de la pathologie (Lostal et al., 2010). Cependant, cette technique peut être jusqu'à cent fois moins efficace que l'utilisation d'un seul AAV avec un gène intact et augmenter les doses des doubles AAV pourrait entraîner des complications immunologiques (Llanga et al., 2017).

### **C) Essais cliniques**

Bien qu'aucun essai clinique avec l'utilisation d'AAV n'ait encore été mis en place sur l'audition, il y en a eu une cinquantaine de menés concernant les pathologies de la vision et plus précisément, de la rétine (voir revue : Trapani and Auricchio, 2018; <https://clinicaltrials.gov>). Comme pour la cochlée, l'œil est fermé et donc privilégié pour l'inhibition locale des réponses immunitaires par l'environnement unique intraoculaire et également pour éviter les diffusion et dilution du vecteur compte tenu de la présence de barrières physiques telle que la barrière hémato-rétinienne (Capozzi et al., 2013). Bien que l'acuité visuelle, le réflexe pupillaire et la sensibilité à la lumière puisse être améliorés temporairement, les traitements de déficience visuelle par utilisation d'AAV sont encore aujourd'hui dans l'incapacité de stopper la dégénérescence rétinienne et de restaurer à long terme la vue des patients (voir revue : Trapani and Auricchio, 2018).

### **D) La complexité de l'otoferline**

Bien qu'assimilée aux senseurs calciques des synapses centrales, les synaptotagmines, l'otoferline semble en être différente de par la multiplication de ses rôles. En effet, la liste des fonctions que la communauté scientifique attribue à l'otoferline ne finit pas de s'allonger, avec des démonstrations de son implication dans l'amorçage des vésicules à la membrane plasmique (Vogl et al., 2015); la fusion rapide des vésicules (Johnson and Chapman, 2010; Vincent et al., 2014; Michalski et al., 2017) mais également leur recrutement à la zone active (Pangrsic et al., 2010; Strenzke et al., 2016; Michalski et al., 2017); son lien avec les SNAREs et les canaux calciques Ca<sub>v</sub>1.3 (Ramakrishnan et al., 2009; Hams et al., 2017) et son implication dans l'endocytose des vésicules (Duncker et al., 2013) ou encore dans le trafic endosomal (Redpath et al., 2015).

L'otoferline est codée par 48 exons dont 3 pouvant subir un épissage alternatif : l'exon 6 et 47 pouvant être épissé entièrement et l'exon 31 pouvant être raccourci. Les conséquences de ces modifications pourraient alors conférer aux isoformes des propriétés particulières encore inconnues. En effet, même si la présence ou non de l'exon 47 code pour deux domaines TM différents, le rôle de ces derniers n'a pas encore été exploré.

Bien qu'ayant des propriétés communes à celles de la famille des ferlines, en particulier avec la dysferline (rôle dans la fusion membranaire, interaction avec les canaux calciques et rôle de protéine d'échafaudage (pour revue, voir Johnson, 2017), l'otoferline semble se distinguer. Que ce soit sur la construction du domaine FerA, l'absence du domaine DysF ou sur l'éventuelle fonction d'une mini-ferline aux domaines C2-EF, l'otoferline diffère des autres ferlines. De plus, il est à rappeler que l'otoferline est présente dans le vestibule où elle jouerait le rôle de senseur calcique des cellules ciliées de type-I (Dulon et al., 2009; Vincent et al., 2014), mais également dans le cerveau et d'autres organes (foie, reins, cœur, pancréas, muscles squelettiques) sans qu'aucun rôle ne lui ait été attribué.

Dernièrement, une équipe a détecté par immunofluorescence, la présence de dysferline chevauchant celle de l'actine dans les stéréocils des CCI et CCE (Drescher et al., 2016, Congrès IEB). Les auteurs émettent alors l'hypothèse que la stimulation de la dysferline dans la cochlée, pourrait accélérer la récupération de seuils auditifs tout en étant une clef d'un modèle exo-endocytotique à l'apex des cellules ciliées.

### **E) Autre thérapie cochléaire envisagée: la thérapie cellulaire**

Lors de surdités de légères à moyennes, les patients peuvent bénéficier de prothèses auditives posées dans le conduit externe pour amplifier et filtrer les informations acoustiques. Lors de surdités sensorielles sévères ou profondes, la pose chirurgicale d'un implant cochléaire peut s'avérer nécessaire. L'implant cochléaire a l'avantage de stimuler directement les fibres du nerf auditif, passant outre les cellules ciliées sensorielles endommagées (pour revue, voir Wilson and Dorman, 2008). Cependant, l'implant cochléaire, malgré les nombreux efforts réalisés au cours des dernières années, reste encore peu performant pour une audition de qualité en milieu bruyant ou dans le cadre de l'appréciation de sons complexes tels que la musique.

En plus de la thérapie génique, des stratégies de thérapie cellulaire se développent, consistant à utiliser des cellules souches pour réparer les cellules endommagées ou remplacer les cellules perdues (pour revues, voir Wang and Puel, 2018; Lee and Park, 2018). En effet, les cellules ciliées des mammifères, contrairement à celles des oiseaux par exemple (pour revue, voir : Brignull et al., 2009) sont des cellules quiescentes dans l'impossibilité de se régénérer. Cependant, durant la première semaine post-natale, les cellules de soutien de l'OC de souris peuvent agir *in vivo* comme des progéniteurs de cellules ciliées. Elles peuvent alors soit ré-entrer dans le cycle cellulaire et se diviser

pour donner de nouvelles cellules ciliées, soit se différencier directement (transdifférenciation) en cellules ciliées (Malgrange et al., 2002; Oshima et al., 2007; Cox et al., 2014; Ni et al., 2016; pour revue voir : Franco et Malgrange, 2017). Cette propriété est malheureusement perdue durant la maturation anatomique et physiologique de la cochlée. Manipuler les mécanismes moléculaires impliqués dans cette différenciation pourrait être utile pour stimuler une régénération de cellules ciliées détruites, après un traumatisme acoustique par exemple. Enfin, les auteurs d'une très récente étude ont utilisé des progéniteurs épithéliaux otiques (OEP) dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) qu'ils ont injectés dans la fenêtre ronde afin d'examiner le potentiel de greffe et de différenciation des OEP en cellules ciliées dans l'organe de Corti de souris *Slc26a4-null* présentant une perte de cellules ciliées (Chen et al., 2018). Quelques cellules transplantées se sont intégrées quatre semaines plus tard, aux sites où les CCI avaient disparu, formant des connections synaptiques avec les neurones natifs du ganglion spiral.



## Chapitre IV : Étude du rôle des isoformes des canaux $Ca_v1.3$ dans la transmission synaptique des CCI par édition génique CRISPR-Cas9

Dans les synapses à rubans des CCI, l'otoférine est le senseur calcique déclenchant l'exocytose des vésicules synaptiques. Ce sont les canaux calciques  $Ca_v1.3$  qui sont à la base de l'influx calcique intracellulaire au voisinage des vésicules synaptiques et de l'otoférine. En contrôlant l'exocytose synaptique des CCI, ces canaux sont essentiels à l'audition (Kollmar et al. 1997; Platzer et al., 2000; Brandt et al., 2003). D'un épissage alternatif de l'exon 43 du gène *CACNA1D* résulte deux isoformes du canal  $Ca_v1.3$  dans sa partie C-terminale régulatrice (Scharinger et al., 2015) : l'isoforme courte ( $Ca_v1.3_S$ ) présentant une composante rapide dans son inactivation et l'isoforme longue ( $Ca_v1.3_L$ ) ne présentant que peu ou pas d'inactivation. Dans le but de différencier les rôles spécifiques de ces deux isoformes de canaux calciques dans l'exocytose des CCI, nous avons utilisé la technologie CRISPR-Cas9, nous permettant de supprimer spécifiquement la partie C-terminale modulatrice des canaux  $Ca_v1.3_L$ , codée par l'exon 43 du gène *CACNA1D*.

### A) Expression de l'enzyme Cas9

Afin d'estimer la sûreté de l'expression à long terme de l'enzyme Cas9 dans un type cellulaire, une étude a évalué l'expression constitutive de cette protéase dans les neurones de l'hippocampe (Platt et al., 2014). Les souris sont fertiles, ne présentent aucune anomalie morphologique et au niveau cellulaire, aucune anomalie n'a été retrouvée au niveau de lésions de l'ADN ou de marqueurs d'apoptose. Les neurones de l'hippocampe sont également comparables à ceux des souris WT, suite aux enregistrements électrophysiologiques effectués. Après ces vérifications, les auteurs ont soumis l'expression de la Cas9 sous la dépendance de la Cre-recombinase, actionnée par un promoteur spécifique d'un type neuronal. Cette Cre-recombinase était injectée *via* un AAV contenant également le gRNA. Les auteurs ont alors démontré pour la première fois chez le mammifère *in vivo*, la possibilité de la Cas9 à induire des insertions-délétions géniques spécifiques dans le cerveau en utilisant un gRNA provenant d'un AAV (Platt et al., 2014).

Pour notre étude de délétion de l'isoforme longue du canal calcique  $Ca_v1.3$  uniquement dans les CCI, nous avons alors choisi de nous appuyer sur ces résultats. Pour cela, nous avons utilisé une lignée de souris dont l'expression de la Cas9 dépend du croisement avec une seconde lignée exprimant la Cre-recombinase sous l'action du promoteur du gène de la myosine 15, spécifique des cellules ciliées (Caberlotto et al., 2011). Le croisement de ces lignées nous a permis d'obtenir des portées de souris dont la Cas9 est exprimée spécifiquement dans les cellules ciliées. Le gRNA (ciblant l'exon 47) contenu dans un AAV était injecté par voie intra-cochléaire à P2-P4 chez la souris.

Afin d'alléger ce protocole où le croisement de lignées de souris est nécessaire, nous allons ultérieurement travailler avec un AAV contenant à la fois le gRNA mais aussi la Cas9, qui sera injecté chez des souris WT. Seulement, la taille de l'insert d'un AAV étant limité, nous allons choisir une SaCas9 (*Staphylococcus aureus*) de plus petite taille (3,3 kb) que la SpCas9 (*Streptococcus pyogenes*) classique de 4,3 kb utilisée jusqu'alors. La séquence PAM ne sera plus NGG mais NNGRRT (R pour A ou G).

## B) Rôle des isoformes $Ca_v1.3_L$ des CCI

Nos résultats montrent que les isoformes  $Ca_v1.3_L$  des canaux calciques présents à la membrane plasmique des CCI sont indispensables à l'audition. En effet, lorsque la partie C-terminale régulatrice du canal calcique est enlevée par action de la Cas9, les souris CRISPR- $Ca_v1.3_L$  présentent une perte auditive sévère mesurée par une élévation d'environ 30 dB des seuils ABR, en l'absence de modification des otoémissions issues de l'activité des CCE. Ce phénotype indique une synaptopathie des CCI décrite par défaut de transmission synaptique entre les CCI et les fibres du nerf auditif.

Nous avons alors analysé ce phénotype au niveau cellulaire par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière afin de mesurer à la fois le signal calcique et l'exocytose des CCI. Ces dernières, présentent un courant calcique de plus grande amplitude avec une inactivation plus importante. Ces résultats sont en accord avec l'étude pharmacologique de Vincent et al., 2017.

Nos résultats montrent que les CCI CRISPR- $Ca_v1.3_L$  présentent une exocytose des vésicules du RRP normale, suggérant que ces isoformes  $Ca_v1.3_L$  ne sont pas essentielles au déclenchement de la fusion rapide des vésicules. Les isoformes courtes  $Ca_v1.3_S$ , à inactivation rapide, semblent donc suffisantes pour assurer cette fonction. Cependant, lors de stimulations répétées, les CCI CRISPR- $Ca_v1.3_L$  sont dans l'incapacité de soutenir l'exocytose. Les canaux  $Ca_v1.3_L$  à faible inactivation semblent donc importants pour le recrutement des vésicules synaptiques à la zone active.

Nous pensons que les formes courtes  $Ca_v1.3_S$ , forment des nanodomains calciques avec les vésicules du RRP des CCI et sont suffisantes à leur fusion instantanée. Les formes longues  $Ca_v1.3_L$  quant à elles, permettraient une diffusion calcique intracellulaire plus large et plus profonde, permettant de recruter les vésicules à plus grande distance des sites de fusion. Il a été montré dans les neurones de l'hippocampe, que les isoformes courtes des canaux calciques  $Ca_v1.3$  pourraient s'associer en clusters fonctionnels et coopératifs, de 2 canaux ou plus afin de faciliter le courant calcique (Moreno et al., 2016). Il pourrait en être de même avec les canaux  $Ca_v1.3_S$  des CCI, leur permettant de cette façon de déclencher la fusion rapide des vésicules.

En choisissant la technique CRISPR-Cas9 pour supprimer la partie C-terminale régulatrice des canaux  $Ca_v1.3_L$ , nous savions que différents génotypes cellulaires pouvaient être retrouvés le long de

l'organe de Corti (effet mosaïque). En effet, par un manque de transfection et d'expression du gRNA ou un manque de clivage efficace de la Cas9 sur les deux allèles, une mosaïque d'effets du CRISPR allait être présente suivant les CCI. Nous avons donc choisi de ne mener les mesures électrophysiologiques uniquement chez les souris ayant un seuil ABR > 65 dB, nous suggérant à la fois une bonne infection de l'AAV portant le gRNA et une action de l'enzyme Cas-9 sur un nombre conséquent de cellules. De plus, la présence du GFP dans l'AAV nous a permis de vérifier la qualité de l'infection du virus dans les CCI avant d'effectuer les enregistrements cellulaires.

Afin de réduire l'effet mosaïque sur les CCI, nous allons dans les études futures utiliser des souris hétérozygotes pour l'allèle du gène *CACNA1D* du canal calcique  $Ca_v1.3$  (souris *CACNA1D*<sup>+/-</sup>). En effet, dans notre étude, chaque CCI pouvait avoir soit deux allèles du gène *CACNA1D* touchés par la Cas9, soit un seul ou aucun. En utilisant ces souris hétérozygotes, la Cas9 ne devra effectuer qu'une cassure double-brin sur l'allèle WT pour que l'effet CRISPR- $Ca_v1.3_L$  soit mesurable à la fois sur le phénotype auditif et cellulaire.

## Chapitre V : Perspectives de l'édition génique CRISPR-Cas9 appliquée aux pathologies de l'oreille interne

### A) Edition du génome et pathologies de l'organe de Corti

L'étude de Gao et al., (2018) est la première utilisant la technologie CRISPR-Cas9 dans l'organe de Corti *in vivo* chez la souris. Les auteurs ont utilisé un modèle murin (*Beethoven*) d'une surdité post-linguale chez l'homme due à une mutation non-sens dominante-négative sur le gène *TMCI*. Un effet dominant-négatif fait référence à une protéine qui, codée par le gène muté, perd sa fonction mais interfère avec la fonction de l'allèle normal. De telles mutations caractérisent les gènes codant pour des protéines de structure ou capables de former des homo- ou hétérodimères, provoquant des modifications conformationnelles qui affectent la fonction de la protéine normale. Concernant la mutation dominante-négative sur le gène *TMCI*, les auteurs ont utilisé un complexe lipidique cationique contenant à la fois le gRNA et l'enzyme Cas9, qu'ils ont injecté avec de la lipofectamine dans la *scala media* par cochléostomie. Cette technique leur a permis de cibler majoritairement et d'éteindre l'allèle muté, même s'il ne diffère de l'allèle WT que d'une seule base. L'expression de l'allèle WT suffit à lui seul pour permettre une restauration significative des seuils auditifs.

Cette étude est encourageante dans les traitements à venir par CRISPR-Cas9 de certaines pathologies dues à une mutation de type autosomal dominant. En effet, dans le cas d'une dystrophie de la rétine, une étude a montré également chez la souris, la capacité de la technologie CRISPR à supprimer l'allèle mutant, empêchant alors la protéine rhodopsine malformée de s'accumuler dans les photorécepteurs, dont la fonction est alors restaurée (Bakondi et al., 2016 ; pour revue voir Chrenek et al., 2017). À ce jour, aucune mutation dominante-négative n'a été mise en évidence concernant le canal calcique  $Ca_v1.3$ .

### B) Supprimer l'expression d'un gène

Une autre façon d'éteindre un gène pourrait être d'utiliser des nucléotides anti-sens. En effet, en plus d'avoir été restaurée par l'AAV-Anc80, la fonction auditive du modèle murin de la surdité *Ush1c* provoquée par une mutation dominante négative sur l'une des isoformes de l'harmonine 1b, a également été étudié par Lentz et al., (2013) en utilisant des oligonucléotides anti-sens (ASO). Les auteurs ont démontré que les ASO pouvaient cibler spécifiquement le site d'épissage de l'ARNm et ainsi supprimer la mutation non-sens, prévenant alors la perte auditive et vestibulaire de la souris (Lentz et al., 2013). L'avantage de l'approche des ASO est que tous les sites d'épissages peuvent être exprimés. Cependant des injections systémiques ont été nécessaires pendant plusieurs mois afin de

maintenir une restauration à long terme. De plus, seul un faible pourcentage des ARNm est supprimé (5-22%, Lentz et al., 2013) et ne peut permettre l'élimination complète d'une isoforme.

Une étude plus récente a reporté les effets d'un retardement de la progression de la perte auditive des souris *Beethoven* (Shibata et al., 2016). En utilisant une seule injection intra-cochléaire d'un micro-ARN artificiel contenu dans un AAV, l'expression de l'allèle portant la mutation dominante est supprimée et les souris ont un seuil auditif amélioré d'environ 40 dB pendant approximativement 8 mois, temps de leur étude (Shibata et al., 2016).

### C) Évolution de l'édition génique par CRISPR-Cas9

Un problème majeur de l'utilisation du CRISPR est la mutagenèse potentielle hors cible (off-target). Bien que les événements off-targets ne soient pas détectés dans la plupart des études publiées *in vivo*, des méthodes d'analyses non biaisées et hautement sensibles du génome entier devront être effectuées dans de futures études visant l'utilisation clinique chez l'homme. De nouvelles variantes ou orthologues des nucléases Cas9 avec une fidélité plus importante sont actuellement développées et testées (Slaymaker et al., 2016; Giannelli et al., 2018; Li et al., 2018).

L'avenir de l'édition génique par technique du CRISPR-Cas9 sera probablement la possibilité d'effectuer des réparations homologues directes (voie HDR) suite à la cassure double-brin de la Cas9. En effet, cette voie permettant de corriger précisément un défaut génique ne peut encore se faire dans les cellules post-mitotiques telles que les cellules ciliées.

Une autre technique dérivée de CRISPR, est l'édition de bases permettant de corriger des mutations uniques de nucléotides sans générer de cassure double brins (voir revue Yu and Wu, 2018). En effet, la fusion d'une cytidine désaminase avec une Cas9 désactivée (dCas9, conservant uniquement la fonction de liaison à l'ADN) a permis la conversion d'une cytosine (C) en thymine (T) au site voulu avec une haute spécificité (Komor et al., 2016; Kim et al., 2017). Avec toutes ces avancées rapides, l'édition génique thérapeutique par le CRISPR deviendra sûrement prochainement un véritable traitement pour les surdités d'origine génétique.

## Chapitre VI : Conclusion générale

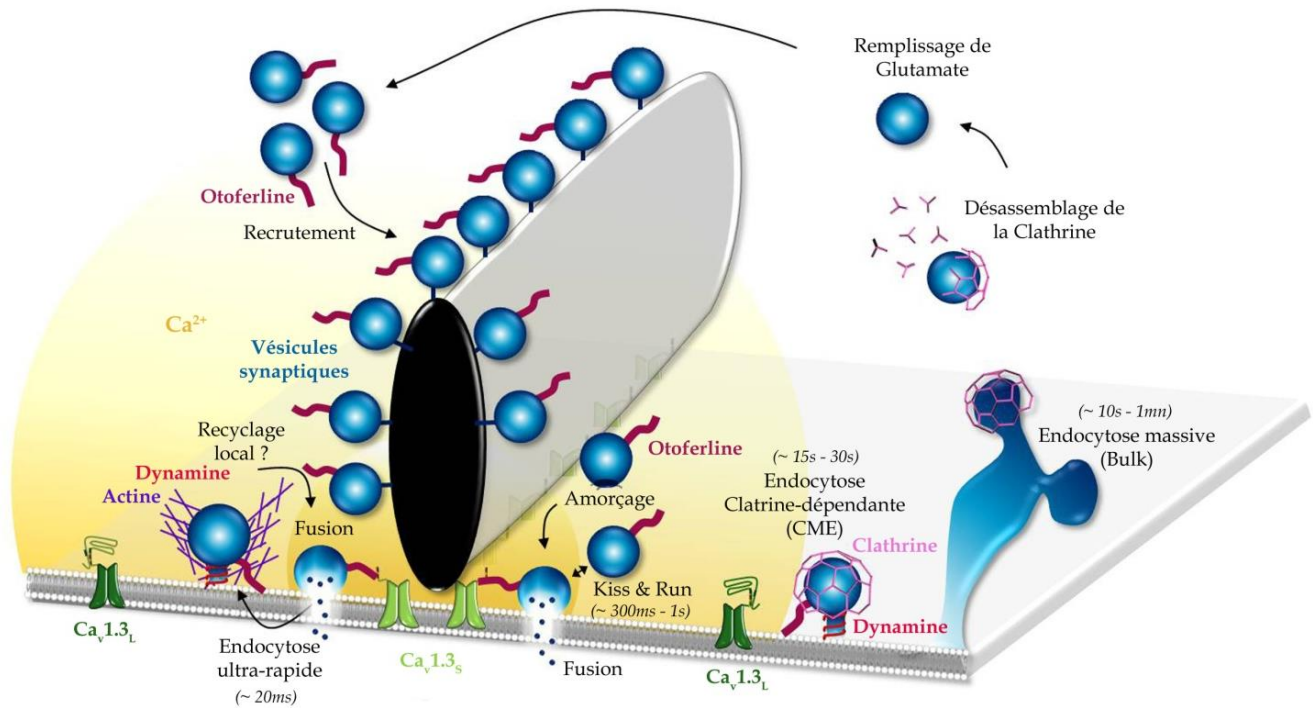
Le senseur calcique otoferline, ainsi que les canaux calciques  $Ca_v1.3$  présents à la membrane plasmique sont les deux acteurs clefs de la transmission synaptique des cellules ciliées auditives. Nous avons pu confirmer par modification génétique du domaine C2-C de l'otoferline, son implication dans l'étape de recrutement de vésicules synaptiques à la zone active et nous montrons qu'elle est également cruciale à la fusion rapide des vésicules formant le RRP.

L'expression de mini-Otof chez des souris *Otof*<sup>-/-</sup> nous a permis de montrer que la partie C-terminale de l'otoferline (C2-EF) est importante dans l'exocytose rapide mais que la forme entière à six domaines C2 reste nécessaire pour une transmission synaptique efficace. Nous pensons que l'otoferline a la capacité de multiplier ses liaisons avec les canaux calciques et les protéines SNAREs permettant une fusion efficace.

Les mini-Otof, moins efficaces dans la transmission synaptique que l'otoferline entière, ont été un outil intéressant dans la mise en évidence d'une endocytose ultra-rapide, ayant lieu simultanément avec l'exocytose. Cette voie d'endocytose ultra-rapide ( $\tau \sim 10$  ms) dynamine-dépendante que nous avons mise en évidence nous permettrait d'expliquer le maintien de l'homéostasie membranaire des synapses des CCI (Fig.18). De plus, nous pensons que l'endocytose ultra-rapide est également dépendante de l'otoferline, suite à l'absence de l'effet de l'inhibiteur de dynamine sur la réponse de capacité membranaire des CCI *Otof*<sup>-/-</sup>. Nous proposons donc que l'otoferline ait une double fonction de senseur calcique à la fois pour l'exocytose et pour l'endocytose et aide ainsi à maintenir un équilibre synaptique.

Les interactions potentielles entre l'otoferline, *via* les domaines C2-D ou C2-ABDF, et les  $Ca_v1.3$  ont été établies à partir d'expériences biochimiques *in vitro* (Ramakrishnan et al., 2009; Hams et al., 2017). Suite à l'expression *in vivo* des mini-Otof contenant les trois derniers domaines C2 en C-terminal (C2-DEF) dans les CCI, nous avons confirmé l'interaction directe ou indirecte de la partie C-terminale de l'otoferline avec les isoformes courtes  $Ca_v1.3_S$ . En effet, la composante rapide de l'inactivation du courant calcique est absente chez les CCI *Otof*<sup>-/-</sup> et l'expression de ces mini-Otof a permis de restaurer partiellement cette inactivation rapide, caractéristique des  $Ca_v1.3_S$ . Ces derniers, ne possédant pas de partie C-terminale régulatrice, présentent une inactivation rapide, propriété absente chez les  $Ca_v1.3_L$ . Par édition génique, nous avons pu distinguer les rôles physiologiques de ces deux isoformes des canaux calciques. Nous montrons que les  $Ca_v1.3_L$  sont indispensables à l'audition puisque la suppression par la technique du CRISPR-Cas9 de leur partie C-terminale, entraîne une surdité sévère. Cette surdité s'explique au niveau synaptique par l'absence d'un recrutement efficace des vésicules à la ZA des CCI, tandis que l'exocytose rapide est maintenue. Une explication serait que les  $Ca_v1.3_L$ , situés au voisinage des ZA et ne présentant pas d'inactivation, seraient alors requis pour une diffusion calcique intracellulaire large et profonde, permettant le recrutement des vésicules

synaptiques (Fig.18). Les  $Ca_v1.3_s$ , situés sous le ruban, formeraient des nanodomains avec les vésicules synaptiques du RRP, permettant une concentration calcique locale et transitoire, suffisante au déclenchement de l'exocytose rapide de ces vésicules prêtes à fusionner.



**Figure 18: Schéma simplifié récapitulatif de l'organisation du cycle vésiculaire à la synapse des CCI (Création personnelle) :** Aux synapses des CCI, après s'être chargées en glutamate (*via* les transporteurs glutamatergiques Vglut-3 et la pompe à protons vésiculaire V-ATPase), les **vésicules synaptiques** sont amenées au ruban par un recrutement dépendant de l'**otoferline** et du  $Ca^{2+}$ . Ce sont les canaux  $Ca_v1.3_L$ , présents au voisinage des ZA et ne présentant qu'une faible inactivation qui permettraient une diffusion large et profonde du nuage calcique, indispensable au recrutement soutenu et efficace des vésicules synaptiques des CCI. Suite à leur ouverture, les canaux calciques  $Ca_v1.3_S$  situés en "strips" sous le ruban, à distance nanométrique des vésicules, permettraient une élévation rapide et focalisée de la concentration calcique intracellulaire produisant la fusion des vésicules amorcées. Après avoir fusionné, les vésicules synaptiques sont capturées par endocytose afin de soutenir la transmission synaptique. Nous pensons que plusieurs voies d'endocytose coexistent à différentes échelles de temps, en fonction du taux de l'exocytose, afin de maintenir une homéostasie membranaire. Les voies **clathrine**-dépendantes comme la **CME** (clathrin-mediated endocytosis) et l'**endocytose massive** ou les voies clathrine-indépendante comme la fusion transitoire du "**kiss and run**", permettent de prévenir l'expansion de la membrane plasmique présynaptique mais présentent une dynamique temporelle trop lente pour pouvoir à elles seules compenser l'exocytose rapide des CCI. Nous avons montré qu'une voie d'endocytose **ultra-rapide** dépendante de la **dynamine**, de l'**otoferline** et probablement de l'**actine**, peut avoir lieu à la synapse des CCI. Un recyclage rapide local des vésicules pourrait alors avoir lieu et contribuer à une exocytose soutenue.

# **Références**

# **Bibliographiques**



- Achanzar WE, Ward S. (1997) A nematode gene required for sperm vesicle fusion. *J Cell Sci*; 110:1073–1081.
- Ahmed ZM, Goodyear R, Riazuddin S, Lagziel A, Legan PK, Behra M, Burgess SM, Lilley KS, Wilcox ER, Riazuddin S, Griffith AJ, Frolenkov GI, Belyantseva IA, Richardson GP, Friedman TB. (2006) The tip-link antigen, a protein associated with the transduction complex of sensory hair cells, is protocadherin-15. *J. Neurosci.* 26,7022–7034.
- 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.
- Al-Moyed H, Cepeda AP, Jung S, Moser T, Kügler S, Reisinger E (2018) A dual AAV viral vector approach partially restores exocytosis and rescues hearing in deaf otoferlin knock-out mice. Meeting Abstract, poster 134, ARO San Diego.
- Armstrong CM, Matteson DR. (1985) Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science.* 227:65-7
- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A. & Jinek, (2014) M. Structural basis of PAM dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* 513, 569–573.
- Anderson LV, Davison K, Moss JA, Young C, Cullen MJ, Walsh J, Johnson MA, Bashir R, Britton S, Keers S, Argov Z, Mahjneh I, Fougereousse F, Beckmann JS, Bushby KM (1999) Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet.*; 8:871-7
- Ang, A.L., Folsch, H., Koivisto, U.M., Pypaert, M. and Mellman, I. (2003) The Rab8 GTPase selectively regulates AP-1B-dependent basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.*, 163, 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.
- Antonny B, Burd C2, De Camilli P3, Chen E4, Daumke O5, Faelber K5, Ford M6, Frolov VA7,8, Frost A9, Hinshaw JE10, Kirchhausen T11,12, Kozlov MM13, Lenz M14, Low HH15, McMahon H16, Merrifield C17, Pollard TD18, Robinson PJ19, Roux A20, Schmid S21. (2016) Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *EMBO J.*; 35:2270-2284
- Aran JM, Erre JP, Lima da Costa D, Debarh I, Dulon D. (1999) Acute and chronic effects of aminoglycosides on cochlear hair cells. *Ann N Y Acad Sci* 884:60-8
- Art JJ, Fettiplace R, Fuchs PA. Synaptic hyperpolarization and inhibition of turtle cochlear hair cells. *J Physiol.* 1984; 356:525–550
- Asai Y, Pan B, Nist-Lund C, Galvin A, Lukashkin AN, Lukashkina VA, Chen T, Zhou W, Zhu H, Russell IJ, Holt JR, Géléoc GSG (2018) Transgenic Tmc2 expression preserves inner ear hair cells and vestibular function in mice lacking Tmc1. *Sci Rep*; 8:12124
- Askew C, Rochat C, Pan B, Asai Y, Ahmed H, Child E, Schneider BL, Aebischer P, Holt JR. (2015) Tmc gene therapy restores auditory function in deaf mice. *SciTransl Med* 7:295ra108.
- Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. (1965) Adenovirus-associated defective virus particles. *Science.* 149:754-6

- Bai J, Tucker WC, Chapman ER (2004) PIP2 increases the speed of response of synaptotagmin and steers its membrane-penetration activity toward the plasma membrane. *Nat Struct Mol Biol.* ; 11:36-44
- Bakondi B, Lv W, Lu B, Jones MK, Tsai Y, Kim KJ, Levy R, Akhtar AA, Breunig JJ, Svendsen CN, Wang S (2016) In Vivo CRISPR/Cas9 Gene Editing Corrects Retinal Dystrophy in the S334ter-3 Rat Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Mol Ther.* 24:556-63
- Banerjee A, Barry VA, DasGupta BR, Martin TF. (1996) N-Ethylmaleimide-sensitive factor acts at a pre-fusion ATP-dependent step in Ca<sup>2+</sup>-activated exocytosis. *J. Biol. Chem.* 271:20223–26
- 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.*; 423:168-72
- Barthélémy F, Defour A, Lévy N, Krahn M, Bartoli M. (2018) Muscle Cells Fix Breaches by Orchestrating a Membrane Repair Ballet. *J Neuromuscul Dis.* 5:21-28
- Bartlett EL. (2013) The organization and physiology of the auditory thalamus and its role in processing acoustic features important for speech perception. *Brain Lang.*; 126:29-48
- Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M, Richard I, Marchand S, Bourg N, Argov Z, Sadeh M, Mahjneh I, Marconi G, Passos-Bueno MR, Moreira Ede S, Zatz M, Beckmann JS, Bushby K. (1998) A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet.*; 20:37-42
- Berger SM, Bartsch D. (2014) The role of L-type voltage-gated calcium channels Cav1.2 and Cav1.3 in normal and pathological brain function. *Cell Tissue Res.* 357:463-76
- Beutner D, Voets T, Neher E, Moser T. (2001) Calcium Dependence of Exocytosis and Endocytosis at the Cochlear Inner Hair Cell Afferent Synapse *Neuron.*; 29:681-90
- 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.*; 28:1798-803
- Beurg, M., Fettiplace, R., Nam, J. H. & Ricci, A. J. (2009) Localization of inner hair cell mechanotransducer channels using high-speed calcium imaging. *Nat. Neurosci.* 12, 553–558.
- Beurg, M., Michalski, N., Safieddine, S., Bouleau, Y., Schneggenburger, R., Chapman, E. R., Petit, C., and Dulon, D. (2010) Control of exocytosis by synaptotagmins and otoferlin in auditory hair cells. *J. Neurosci.* 30, 13281–13290.
- Beurg M, Cui R, Goldring AC, Ebrahim S, Fettiplace R, Kachar B (2018) Variable number of TMC1-dependent mechanotransducer channels underlie tonotopic conductance gradients in the cochlea. *Nat Commun.* 9:2185
- 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.
- Ben-Johny M, Yue DT. (2014) Calmodulin regulation (calmodulation) of voltage-gated calcium channels. *J Gen Physiol.* 157:1657-70
- Beyenbach KW, Wiczorek H (2006) The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol* 209:577-589.

- Blanchet C, Erostequi C, Sugasawa M, Dulon D. (1996) Acetylcholine-Induced Potassium Outer Hair Cells : Its Dependence Receptors Current of Guinea Pig on a Calcium Influx through nicotinic-like receptors. *J Neurosci.*; 16:2574–2584.
- Bock G, Gebhart M, Scharinger A, Jangsangthong W, Busquet P, Poggiani C, Sartori S, Mangoni ME, Sinnegger-Brauns MJ, Herzog S, Striessnig J, Koschak A. (2011) Functional properties of a newly identified C-terminal splice variant of Ca(V)1.3 L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *The Journal of Biological Chemistry* 286:42736–42748.
- Boumil RM1, Letts VA, Roberts MC, Lenz C, Mahaffey CL, Zhang ZW, Moser T, Frankel WN. (2010) A Missense Mutation in a Highly Conserved Alternate Exon of Dynamin-1 Causes Epilepsy in Fitful Mice. *PLoS Genet.*; 6. e1001046.
- Brandt A, Striessnig J, Moser T. (2003) CaV1.3 Channels Are Essential for Development and Presynaptic Activity of Cochlear Inner Hair Cells. *J Neurosci.* 23:10832-40
- Brandt A, Khimich D, Moser T. (2005) Few CaV1.3 Channels Regulate the Exocytosis of a Synaptic Vesicle at the Hair Cell Ribbon Synapse. *J Neurosci.* 25:11577-85
- Brewer KD, Bacaj T, Cavalli A, Camilloni C, Swarbrick JD, Liu J, Zhou A, Zhou P, Barlow N, Xu J, Seven AB, Prinslow EA, Voleti R, Häussinger D, Bonvin AM, Tomchick DR, Vendruscolo M, Graham B, Südhof TC, Rizo J. (2015) Dynamic binding mode of a Synaptotagmin-1-SNARE complex in solution *Nat Struct Mol Biol.* 22:555-64
- Brignull HR, Raible DW, Stone JS. (2009) Feathers and fins: Non-mammalian models for hair cell regeneration. *Brain Res*;1277:12–23.
- Brown MC (1994) Antidromic responses of single units from the spiral ganglion. *J Neurophysiol.*; 71:1835-47
- Budde T, Meuth S, Pape HC. (2002) Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nat Rev Neurosci.*3:873-83
- Budenz CL, Wong HT, Swiderski DL, Shibata SB, Pflingst BE, Raphael Y. (2015) Differential Effects of AAV.BDNF and AAV.Ntf3 in the Deafened Adult Guinea Pig Ear. *Sci Rep* 5:8619
- Bulankina AV, Moser T (2012) Neural circuit development in the mammalian cochlea. *Physiology (Bethesda)* 27:100-112.
- Bullen A, West T, Moores C, Ashmore J, Fleck RA, MacLellan-Gibson K, Forge A. (2015) Association of intracellular and synaptic organization in cochlear inner hair cells revealed by 3D electron microscopy *J Cell Sci.*; 128:2529-40
- Büning H, Perabo L, Coutelle O, Quadt-Humme S, Hallek M. (2008) Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med.*; 10:717-33
- Bunt AH (1971) Enzymatic digestion of synaptic ribbons in amphibian retinal photoreceptors. *Brain Res* 25:571–577.
- Buscail L, Bournet B, Vernejoul F, Cambois G, Lulka H, Hanoun N, Dufresne M, Meulle A, Vignolle-Vidoni A, Ligat L, Saint-Laurent N, Pont F, Dejean S, Gayral M, Martins F, Torrisani J, Barbey O, Gross F, Guimbaud R, Otal P, Lopez F, Tiraby G, Cordelier P. (2015) First-in-man phase1 clinical

trial of gene therapy for advanced pancreatic cancer: Safety, biodistribution, and preliminary clinical findings, *Mol Ther.* 23:779–789.

Caberlotto E, Michel V, Foucher I, Bahloul A, Goodyear RJ, Pepermans E, Michalski N, Perfettini I, Alegria-Prévoit O, Chardenoux S, Do Cruzeiro M, Hardelin JP, Richardson GP, Avan P, Weil D, Petit C. (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 U S A.* 108:5825-30

Calcedo R, Vandenberghe LH, Gao G, Lin J, Wilson JM. (2009) Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J. Infect. Dis.* 199:381–90

Capozzi ME, Gordon AY, Penn JS, Jayagopal A. (2013) Molecular imaging of retinal disease. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 29, 275–286

Carter PJ, Samulski RJ. (2000) Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles. *Int J Mol Med.* 6:17-27

Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.;* 57:411-25

Catterall WA. (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:a003947

Chakrabarti R, Michanski S, Wichmann C. (2018) Vesicle sub-pool organization at inner hair cell ribbon synapses. *EMBO Rep.* e44937

Chamberlain K, Riyad JM, Weber T. (2016) Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids

Chapman ER. (2008) How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annual Review of Biochemistry* 77:615–641. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.062005.101135

Chapochnikov NM, Takago H, Huang CH, Pangršič T, Khimich D, Neef J, Auge E, Göttfert 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.;* 83:1389-403

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

Chen J, Hong F, Zhang C, Li L, Wang C, Shi H, Fu Y, Wang J. (2018) Differentiation and transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived otic epithelial progenitors in mouse cochlea. *Stem Cell Res Ther.* 9:230

Chien WW, Isgrig K, Roy S, Belyantseva IA, Drummond MC, May LA, Fitzgerald TS, Friedman TB, Cunningham LL (2015) Gene Therapy Restores Hair Cell Stereocilia Morphology in Inner Ears of Deaf Whirler Mice. *Mol Ther.* 24:17-25

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.;* 31:5682-92

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

- Choi BY, Ahmed ZM, Riazuddin S, Bhinder MA, Shahzad M, Husnain T, Riazuddin S, Griffith AJ, Friedman TB. (2009) Identities and frequencies of mutations of the otoferlin gene (OTOF) causing DFNB9 deafness in Pakistan. *Clin Genet.* 75:237-43
- Chrenek MA, Nickerson JM, Boatright JH. (2016) CRISPR challenges in treating retinal disease. *Asia Pac J Ophthalmol.* 5:304-8
- Cingolani LA, Goda Y (2008) Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci* 9:344-356.
- Cox BC, Chai R, Lenoir A, Liu Z, Zhang L, Nguyen DH, Chalasani K, Steigelman KA, Fang J, Rubel EW, Cheng AG, Zuo J. (2014) Spontaneous hair cell regeneration in the neonatal mouse cochlea in vivo. *Development*; 141:816–829.
- 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.
- Curtis BM, Catterall WA. (1984) Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry.* 23:2113-8
- Curtis BM, Catterall WA. (1986) Reconstitution of the voltage-sensitive calcium channel purified from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry.* 25:3077-83
- Cyranoski D (2016) CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature.* 539(7630): 479.
- Delacroix L, Malgrange B. (2015) Cochlear afferent innervation development. *Hear Res.*; 330:157–69. doi: 10.1016
- DeVries SH (2001) Exocytosed protons feedback to suppress the Ca<sup>2+</sup> current in mammalian cone photoreceptors. *Neuron* 32:1107-1117.
- Dallos P (1992) The active cochlea. *J Neurosci* 12:4575-4585.
- Dallos P, Wu X, Cheatham MA, Gao J, Zheng J, Anderson CT, Jia S, Wang X, Cheng WH, Sengupta S, He DZ, Zuo J. (2008) Prestin-based outer hair cell motility is necessary for mammalian cochlear amplification. *Neuron*; 58:333-9
- Davis DB, Delmonte AJ, Ly CT, McNally EM. (2000) Myoferlin, a candidate gene and potential modifier of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* ; 9:217-26
- de Wit H, Walter AM, Milosevic I, Gulyás-Kovács A, Riedel D, Sørensen JB, Verhage M. (2009) Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes. 138:935-46
- Doherty KR1, Cave A, Davis DB, Delmonte AJ, Posey A, Earley JU, Hadhazy M, McNally EM. (2005) Normal myoblast fusion requires myoferlin. *Development.* 132:5565-75
- Drescher DG, Drescher MJ, Selvakumar D, Genene Holt A (2016) Dysferlin as a correlate of cochlear membrane fusion and repair, IEB Montpellier.

- Duan D, Sharma P, Yang J, Yue Y, Dudus L, Zhang Y, Fisher KJ, Engelhardt JF. (1998) Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Virol.* 72:8568-77
- 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*; 10:907-15
- 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.
- Dulon D, Mosnier I, Bouccara D. Ototoxicité Médicamenteuse. EMC. Doi : 10.1016/S0246-0351(12)39238-6
- Dulon D, Papal S, Patni P, Cortese M, Vincent PF, Tertrais M, Emptoz A, Tlili A, Bouleau Y, Michel V, Delmaghani S, Aghaie A, Pepermans E, Alegria-Prevot O, Akil O, Lustig L, Avan P, Safieddine S, Petit C, El-Amraoui A. (2018) Clarin-1 gene transfer rescues auditory synaptopathy in model of Usher syndrome. *J Clin Invest.* 128:3382-3401
- Duncker SV, Franz C, Kuhn S, Schulte U, Campanelli D, Brandt N, Hirt B, Fakler B, Blin N, Ruth P, Engel J, Marcotti W, Zimmermann U, Knipper M. (2013) Otoferlin Couples to Clathrin-Mediated Endocytosis in Mature Cochlear Inner Hair Cells. *J Neurosci.*; 33:9508-19
- Edmonds BW, Gregory FD, Schweizer FE. (2004) Evidence that fast exocytosis can be predominantly mediated by vesicles not docked at active zones in frog saccular hair cells. *J Physiol.*; 560:439-50
- Eich ML, Dembla E, Wahl S, Dembla M, Schwarz K, Schmitz F. (2017) The Calcineurin-Binding, Activity-Dependent Splice Variant Dynamin1xb Is Highly Enriched in Synapses in Various Regions of the Central Nervous System. *Front Mol Neurosci.* 10:230
- Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann SF (1994) Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell.*; 79:705– 715.
- Emptoz A. (2016) Manuscrit de thèse, Université Pierre et Marie Curie, Paris : Restauration, par thérapie génique, de l'audition et de l'équilibre chez des souris modèles de surdités et troubles vestibulaires humains. <https://www.theses.fr/166902195>
- Emptoz A, Michel V, Lelli A, Akil O, Boutet de Monvel J, Lahlou G, Meyer A, Dupont T, Nouaille S, Ey E, Franca de Barros F, Beraneck M, Dulon D, Hardelin JP, Lustig L, Avan P, Petit C, Safieddine S. (2017) Local gene therapy durably restores vestibular function in a mouse model of Usher syndrome type 1G *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 114:9695-9700
- 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.
- Evans CS, He Z, Bai H, Lou X, Jeggle P, Sutton RB, Edwardson JM, Chapman ER. (2016) Functional analysis of the interface between the tandem C2 domains of synaptotagmin-1. *Mol Biol Cell.*; 27:979-89
- Eybalin M (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea *Physiol rev.*; 73:309-73

- Fernandez I, Arac, D, Ubach J, Gerber SH, Shin O, Gao Y, Anderson RG, Südhof TC, Rizo J. (2001) Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: Synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine. *Neuron* 32:1057–1069.
- Fernandez-Chacon R, Königstorfer A, Gerber SH, Garcia J, Matos MF, Stevens CF, Brose N, Rizo J, Rosenmund C, Südhof TC. (2001) Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 410:41–49.
- Fesce, R., Grohovaz, F., Valtorta, F. and Meldolesi, J. (1994) Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run' ? *Trends Cell Biol.* 4, 1–4
- Fettiplace R, Hackney CM (2006) The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nat Rev Neurosci.* 7:19-28
- Fettiplace, R., and K. X. Kim. (2014) The physiology of mechano-electrical transduction channels in hearing. *Physiol. Rev.* 94:951–986.
- Fettiplace, R. (2016) Is TMC1 the hair cell mechanotransducer channel ? *Biophys. J.* 111, 3–9
- Fettiplace, R. (2017) Hair Cell Transduction, Tuning, and Synaptic Transmission in the Mammalian Cochlea. *Compr Physiol.* 7:1197-1227
- Flavell SW, Greenberg ME. (2008) Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 31:563-90
- Flores EN, Duggan A, Madathany T, Hogan AK, Márquez FG, Kumar G, Seal RP, Edwards RH, Liberman MC, García-Añoveros J (2015) A non-canonical pathway from cochlea to brain signals tissue-damaging noise *Curr Biol* 25:606–612.
- Francis HW, Rivas A, Lehar M, Saito Y, Mouton PR, Ryugo DK. (2006) Efficient quantification of afferent cochlear ultrastructure using design-based stereology. *J Neurosci Methods*; 20:150-8
- Franco B, Malgrange B. (2017) Concise Review: Regeneration in Mammalian Cochlea Hair Cells: Help from supporting cells transdifferentiation. *Stem Cells.* 35:551-556
- Frank T, Rutherford MA, Strenzke N, Neef A, Pangršič 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  $Ca^{2+}$  channels and vesicles to add release sites and promote refilling. *Neuron*; 68:724-38
- Fuchs, P ; Murrow, BW. (1992) Cholinergic inhibition of short (outer) hair cells of the chick's cochlea. *J Neurosci.*; 12:800–809.
- Fuchs PA. (1996) Synaptic transmission at vertebrate hair cells. *Curr Opin Neurobiol.*; 6:514–519.
- Fuchs PA. (2005) Time and intensity coding at the hair cell's ribbon synapse. *J Physiol.*, 566:7-12
- Fuson KL, Montes M, Robert JJ, Sutton RB. (2007) Structure of human synaptotagmin 1 C2AB in the absence of  $Ca^{2+}$  reveals a novel domain association. *Biochemistry.* 46:13041-8
- Galaburda AM. (1986) Role of the thalamus in auditory lateralization: anatomic studies. *Rev Neurol.*; 142:441-4
- Galambos R. (1956) Suppression of auditory nerve activity by stimulation of efferent fibers to cochlea. *J Neurophysiol.* 19:424-37

- Gao X, Tao Y, Lamas V, Huang M, Yeh WH, Pan B, Hu YJ, Hu JH3, Thompson DB, Shu Y, Li Y, Wang H, Yang S, Xu Q, Polley DB, Liberman MC, Kong WJ, Holt JR, Chen ZY, Liu DR. (2018) Treatment of autosomal dominant hearing loss by in vivo delivery of genome editing agents. *Nature*. 553:217-221
- Géléoc GS, Holt JR. (2014) Sound strategies for hearing restoration. *Science*.; 344:1241062
- Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, Südhof TC. (1994) Synaptotagmin I: A major Ca<sup>2+</sup> sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79:717–727 .
- Giannelli SG, Luoni M, Castoldi V, Massimino L, Cabassi T, Angeloni D, Demontis GC, Leocani L, Andreatzoli M, Broccoli V. (2018) Cas9/sgRNA selective targeting of the P23H Rhodopsin mutant allele for treating retinitis pigmentosa by intravitreal AAV9.PHP.B-based delivery. *Hum Mol Genet*. 27:761-779
- Glowatzki E, Fuchs PA. (2000) Cholinergic Synaptic Inhibition of Inner Hair Cells in the Neonatal Mammalian Cochlea. *Science* (80–); 288:2366–2368.
- Glowatzki E, Fuchs PA. (2002) Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci*. 5:147-54
- Gonçalves MA. (2005) Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology*.; 79:3146-62
- Goutman JD. (2012) Transmitter release from cochlear hair cells is phase locked to cyclic stimuli of different intensities and frequencies. *J Neurosci*.; 32:17025-35a
- 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*.; 104:16341-6
- Grant L, Yi E, Glowatzki E. (2010) Two Modes of Release Shape the Postsynaptic Response at the Inner Hair Cell Ribbon Synapse *J Neurosci*.; 30:4210-20
- Gray EG and Pease HL (1971) On understanding the organisation of the retinal receptor synapses. *Brain Res*; 10:1-15
- 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.
- Guillet M, Sendin G, Bourien J, Puel JL, Nouvian R (2016) Actin Filaments Regulate Exocytosis at the Hair Cell Ribbon Synapse. *J Neurosci*. 36:649-54
- György B, Sage C, Indzhukulian AA, Scheffer DI, Brisson AR, Tan S, Wu X, Volak A, Mu D, Tamvakologos PI, Li Y, Fitzpatrick Z, Ericsson M, Breakefield XO, Corey DP, Maguire CA. (2016) Rescue of Hearing by Gene Delivery to Inner-Ear Hair Cells Using Exosome-Associated AAV. *Mol Ther*. 25:379-391
- Hams N, Padmanarayana M, Qiu W, Johnson CP. (2017) Otoferlin is a multivalent calcium-sensitive scaffold linking SNAREs and calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114:8023-8028



- Harsini FM, Chebrolu S, Fuson KL, White MA, Rice AM, Sutton RB. (2018) FerA is a Membrane-Associating Four-Helix Bundle Domain in the Ferlin Family of Membrane-Fusion Proteins. *Sci Rep.*; 8:10949
- Hayashi M, Raimondi A, O'Toole E, Paradise S, Collesi C, Cremona O, Ferguson SM, De Camilli P. (2008) Cell- and stimulus-dependent heterogeneity of synaptic vesicle endocytic recycling mechanisms revealed by studies of dynamin 1-null neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ; 105:2175-80
- Heidrych P, Zimmermann U, Bress A, Pusch CM, Ruth P, Pfister M, Knipper M, Blin N. (2008) Rab8b GTPase, a protein transport regulator, is an interacting partner of otoferlin, defective in a human autosomal recessive deafness form. *Hum Mol Genet.* 17:3814-21
- Helfmann S, Neumann P, Tittmann K, Moser T, Ficner R, Reisinger E. (2011) The crystal structure of the C2A domain of otoferlin reveals an unconventional top loop region. *J Mol Biol.*; 406:479–490.
- Henry, L. and Sheff, D.R. (2008) Rab8 regulates basolateral secretory, but not recycling, traffic at the recycling endosome. *Mol. Biol. Cell*, 19, 2059–2068.
- Heuser, J.E. and Reese, T.S. (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 57, 315–344
- Hinshaw JE, Schmid SL. (1995) Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature.* 374:190-2
- Holt M, Cooke A, Wu MM, Lagnado L. (2003) Bulk membrane retrieval in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *J Neurosci.*; 57:323-36
- Horvath P, Romero DA, Coûté-Monvoisin AC, Richards M, Deveau H, Moineau S, Boyaval P, Fremaux C, Barrangou R. (2008) Diversity, Activity, and Evolution of CRISPR Loci in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 190, 1401–1412.
- Huang H, Yu D, Soong TW. (2013) C-terminal alternative splicing of CaV1.3 channels distinctively modulates their dihydropyridine sensitivity. *Mol Pharmacol.* 84:643-53
- Hudson AW, Birnbaum MJ (1995) Identification of a nonneuronal isoform of synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5895-5899.
- Huth M. E., Ricci A. J., Cheng A. G. (2011) Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection *Int J Otolaryngol*; 2011:937861
- Jackman SL, Turecek J, Belinsky JE, Regehr WG. (2016) The calcium sensor synaptotagmin 7 is required for synaptic facilitation *J Neurosci* 529:88-91
- Jero J, Mhatre AN, Tseng CJ, Stern RE, Coling DE, Goldstein JA, Hong K, Zheng WW, Hoque AT, Lalwani AK. (2001) Cochlear gene delivery through an intact round window membrane in mouse. *Hum Gene Ther.* 12:539-48
- Jiménez JL, Bashir R. (2007) In silico functional and structural characterisation of ferlin proteins by mapping disease-causing mutations and evolutionary information onto three-dimensional models of their C2 domains. *J Neurol Sci.* 260:114-23
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. (2012) A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science.* 337:816-21

- Jing ZI, 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.*; 33:4456-67
- 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.*; 563:177-91
- Johnson CP, Chapman ER. (2010) Otoferlin is a calcium sensor that directly regulates SNARE-mediated membrane fusion. *J Cell Biol.*; 191:187-97
- Johnson CP (2017) Emerging Functional Differences Between the Synaptotagmin and Ferlin Calcium Sensor Families. *Biochemistry.* 56:6413-6417
- Jordan B. (2016) Les débuts de CRISPR en thérapie génique. *Med Sci (Paris)*; 32 : 1035-7
- Jung S, Maritzen T, Wichmann C, Jing Z, Neef A, Revelo NH, Al-Moyed H, Meese S, Wojcik SM, Panou I, Bulut H, Schu P, Ficner R, Reisinger E, Rizzoli SO, Neef J, Strenzke N, Haucke V, Moser T. (2015) Disruption of adaptor protein 21 (AP-21) in cochlear hair cells impairs vesicle reloading of synaptic release sites and hearing. *EMBO L.*; 34:2686-702
- Kawamoto K, Oh SH, Kanzaki S, Brown N, Raphael Y. (2001) The functional and structural outcome of inner ear gene transfer via the vestibular and cochlear fluids in mice. *Mol Ther.* 4:575-85
- Kawashima Y, Géléoc 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 transmembranechannel-like genes. *J. Clin. Invest.* 121:4796–4809.
- Kawashima Y, Kurima K, Pan B, Griffith AJ, Holt JR. (2015) Transmembrane channel-like (TMC) genes are required for auditory and vestibular mechanosensation. *Pflugers Arch.* 467:85–94.
- Kazmierczak P, Sakaguchi H, Tokita J, Wilson-Kubalek EM, Milligan RA, Müller U, Kachar B. (2007) Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature* 449, 87–91.
- Kemp DT. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. (1978) *J Acoust Soc Am*; 64: 1386–91
- Khimich D, Nouvian R, Pujol R, Tom Dieck S, Egnér A, Gundelfinger ED, Moser T. (2005) Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature*; 434:889-94
- Kiang NY (1965) Discharge patterns of single fibers in the cat's auditory nerve. Cambridge, Ma: MIT press.
- Kim YB, Komor AC, Levy JM, Packer MS, Zhao KT, Liu DR. (2017) Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat Biotechnol.* 35:371-376
- Koffler T, Ushakov K and Avraham K. B. (2015) Genetics of Hearing Loss - Syndromic Otolaryngol *Clin North Am.* 48(6): 1041–1061.
- Kollmar R, Montgomery LG, Fak J, Henry LJ, Hudspeth AJ. (1997) Predominance of the alpha1D subunit in L-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels of hair cells in the chicken's cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:14883-8

- Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double stranded DNA cleavage. *Nature*. 533:420-4
- Krahn M, Wein N, Bartoli M, Lostal W, Courrier S, Bourg-Alibert N, Nguyen K, Vial C, Streichenberger N, Labelle V, DePetris D, Pécheux C, Leturcq F, Cau P, Richard I, Lévy N. (2010) A naturally occurring human minidysferlin protein repairs sarcolemmal lesions in a mouse model of dysferlinopathy. *Sci Transl Med*. 2:50ra69
- 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.
- Lai Y, Yue Y, Liu M, Ghosh A, Engelhardt JF, Chamberlain JS, Duan D. (2005) Efficient in vivo gene expression by trans-splicing adeno-associated viral vectors. *Nat Biotechnol*. 23:1435-9
- Lalwani AK, Han JJ, Walsh BJ, Zolotukhin S, Muzyczka N, Mhatre AN. (1997) Green fluorescent protein as a reporter for gene transfer studies in the cochlea. *Hear Res*. 114:139-47
- Landegger LD, Pan B, Askew C, Wassmer SJ, Gluck SD, Galvin A, Taylor R, Forge A, Stankovic KM, Holt JR, Vandenberghe LH. (2017) A synthetic AAV vector enables safe and efficient gene transfer to the mammalian inner ear. *Nat Biotechnol*. 35:280-284
- Lee MY, Park YH. (2018) Potential of Gene and Cell Therapy for Inner Ear Hair Cells. *Biomed Res Int*. 2018:8137614
- Lek A, Lek M, North KN, Cooper ST. (2010) Phylogenetic analysis of ferlin genes reveals ancient eukaryotic origins. *BMC Evol Biol*.; 10:231
- Lek A, Evesson FJ, Sutton RB, North KN, Cooper ST. (2012) Ferlins: Regulators of Vesicle Fusion for Auditory Neurotransmission, Receptor Trafficking and Membrane Repair. *Traffic*. 13:185-94
- 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* 33:5085-94
- Lentz JJ, Jodelka FM, Hinrich AJ, McCaffrey KE, Farris HE, Spalitta MJ, Bazan NG, Duelli DM, Rigo F, Hastings ML. (2013) Rescue of hearing and vestibular function by antisense oligonucleotides in a mouse model of human deafness. *Nat Med*. 19:345-50
- 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
- Lenzi D and von Gersdorff H (2001) Structure suggests function: the case for synaptic ribbons as exocytotic nanomachines. *Bioessays*.; 23:831-40
- Li H., Roblin G., Liu H., Heller S., (2003) Generation of haircells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13495–13500.
- Li L, Shin OH, Rhee JS, Araç D, Rah JC, Rizo J, Südhof T, Rosenmund C. (2006) Phosphatidylinositol phosphates as co-activators of Ca<sup>2+</sup> binding to C2 domains of synaptotagmin 1. *J Biol Chem*.; 281:15845-52

- Li, P., Kleinstiver, B. P., Leon, M. Y., Prew, M. S., Navarro-Gomez, D., Greenwald, S. H., et al. (2018). Allele-specific CRISPR/Cas9 genome editing of the singlebase P23H mutation for rhodopsin associated dominant retinitis pigmentosa. *CRISPR J*, doi: 10.1089/crispr.2017.0009.
- Liberman MC (1982a) Single-neuron labeling in the cat auditory nerve. *Science* 216:1239-1241.
- Liberman MC, Gao J, He DZ, Wu X, Jia S, Zuo J. (2002) Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature* 419:300-4
- 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.*; 31:801-8
- Liberman MC (2017) Noise-induced and age-related hearing loss: new perspectives and potential therapies. *F1000Res* 6:927
- Lipstein N, Sakaba T, Cooper BH, Lin KH, Strenzke N, Ashery U, Rhee JS, Taschenberger H, Neher E, Brose N. (2013) Dynamic Control of Synaptic Vesicle Replenishment and Short-Term Plasticity by Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-Munc13-1 Signaling. *Neuron* 79:82-96
- 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.
- Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, Serrano C, Urtizberea JA, Hentati F, Hamida MB, Bohlega S, Culper EJ, Amato AA, Bossie K, Oeltjen J, Bejaoui K, McKenna-Yasek D, Hosler BA, Schurr E, Arahata K, de Jong PJ, Brown RH Jr. (1998) Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 20:31-6
- 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.
- Llangua T, Nagy N, Conatser L, Dial C, Sutton RB, Hirsch ML. (2017) Structure-Based Designed Nano-Dysferlin Significantly Improves Dysferlinopathy in BLA/J Mice. *Mol Ther.*; 25:2150-2162
- Lostal W, Bartoli M, Bourg N, Roudaut C, Bentaïb A, Miyake K, Guerchet N, Fougerousse F, McNeil P, Richard I. (2010) Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum Mol Genet.* 19:1897-907
- Lory P, Bidaud I, Mezghrani A, Monteil A (2006) Calcium channelopathies: the current challenges. *Med Sci* 22:1028-1031
- Maeda, R. et al. Tip-link protein protocadherin 15 interacts with transmembrane channel-like proteins TMC1 and TMC2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 12907–12912 (2014).
- Malgrange B, Belachew S, Thiry M, Nguyen L, Rogister B, Alvarez ML, Rigo JM, Van De Water TR, Moonen G, Lefebvre PP. (2002) Proliferative generation of mammalian auditory hair cells in culture. *Mech Dev.* 112:79-88
- Manley, G. A. (2000) Cochlear mechanisms from a phylogenetic viewpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11736–11743.

- Marks BI, Stowell MH, Vallis Y, Mills IG, Gibson A, Hopkins CR, McMahon HT. (2001) GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature*; 410 : 231-5.
- Marlin S, Feldmann D, Nguyen Y, Rouillon I, Loundon N, Jonard L, Bonnet C, Couderc R, Garabedian EN, Petit C, Denoyelle F (2010) Temperature-sensitive auditory neuropathy associated with an otoferlin mutation: Deafening fever! *Biochem Biophys Res Commun.* ; 394:737-42
- Mathur P, Yang J. (2015) Usher syndrome: Hearing loss, retinal degeneration and associated abnormalities. *Biochim Biophys Acta*; 1852:406-20
- Matsunaga T, Mutai H, Kunishima S, Namba K, Morimoto N, Shinjo Y, Arimoto Y, Kataoka Y, Shintani T, Morita N, Sugiuchi T, Masuda S, Nakano A, Taiji H, Kaga K. (2012) A prevalent founder mutation and genotype–phenotype correlations of OTOF in Japanese patients with auditory neuropathy. *Clin Genet.* 82:425-32
- Matthews GI, Fuchs P. (2010) The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission *Nat Rev Neurosci.*; 11:812-22
- Mayer A, Wickner W, Haas A. (1996). Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p ( $\alpha$ -SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles. *Cell* 85:83–94
- McMahon HT, Boucrot E. (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12:517-533
- McNeil PL, Kirchhausen T. (2005) An emergency response team for membrane repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 6:499-505
- Meyer AC, Frank T, Khimich D, Hoch G, Riedel D, Chapochnikov 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.
- Meyer AC, Moser T. (2010) Structure and function of cochlear afferent innervation. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.*; 18:441-6
- Meyer A, Petit C, Safieddine S. (2013) Thérapie génique des surdités humaines. *Med Sci* 29:883-9
- Michalski N, Goutman JD, Auclair SM, Boutet de Monvel J, Tertrais M, Emptoz A, Parrin A, Nouaille S, Guillon M, Sachse M, Ciric D, Bahloul A, Hardelin JP, Sutton RB, Avan P, Krishnakumar SS, Rothman JE, Dulon D, Safieddine S, Petit C. (2017) Otoferlin acts as a Ca<sup>2+</sup> sensor for vesicle fusion and vesicle pool replenishment at auditory hair cell ribbon synapses. *Elife.*, 6 e31013
- Miller TM, Heuser JE. (1984) Endocytosis of synaptic vesicle membrane at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol.*; 98:685-98
- Mittal R, Nguyen D, Patel AP, Debs LH, Mittal J, Yan D, Eshraghi AA, Van De Water TR, Liu XZ. (2017) Recent Advancements in the Regeneration of Auditory Hair Cells and Hearing Restoration. *Front Mol Neurosci.* 10:236
- Mohrmann R1, de Wit H, Connell E, Pinheiro PS, Leese C, Bruns D, Davletov B, Verhage M, Sørensen JB. (2013) Synaptotagmin interaction with SNAP-25 governs vesicle docking, priming, and fusion triggering. *J Neurosci.*, 33:14417-30

- Moreno CM, Dixon RE, Tajada S, Yuan C, Opitz-Araya X, Binder MD, Santana LF. (2016) Ca<sup>2+</sup> entry into neurons is facilitated by cooperative gating of clustered CaV1.3 channels. *Elife*. e15744
- Mojica FJM, Diez-Villaseñor C, Soria E, and Juez G (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 36: 244–246
- Mojica, F. J. M., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J. & Soria, E. (2005) Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J. Mol. Evol.* 60, 174–182.
- 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.*; 97:883-8
- 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.*; 34:705-16
- Neher E (1998) Usefulness and limitations of linear approximations to the understanding of Ca<sup>2+</sup> signals. *Cell Calcium* 24:345–357.
- Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, Thakore PI, Moreb EA, Castellanos Rivera RM, Madhavan S, Pan X, Ran FA, Yan WX, Asokan A, Zhang F, Duan D, Gersbach CA. (2016) In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*. 351:403-7
- Ni W, Lin C, Guo L, Wu J, Chen Y, Chai R, Li W, Li H (2016) Extensive supporting cell proliferation and mitotic hair cell generation by in vivo genetic reprogramming in the neonatal mouse cochlea. *J Neurosci* ; 36:8734–8745.
- Nouvian R1, 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 *Nat Neurosci.* 14:411-3
- 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.
- Ohmori, H. (1985). Mechano-electrical transduction currents in isolated vestibular hair cells of the chick. *J. Physiol.* 359:189–217.
- Oliver D, He DZ, Klöcker N, Ludwig J, Schulte U, Waldegger S, Ruppertsberg JP, Dallos P, Fakler B. (2001) Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein. *Science*; 292:2340-3
- Oshima K, Grimm CM, Corrales CE, Senn P, Martinez Monedero R, Géléoc GS, Edge A, Holt JR, Heller S. (2007) Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol*; 8:18–31.
- 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.

- Pan B, Géléoc GS, Asai Y, Horwitz GC, Kurima K, Ishikawa K, Kawashima Y, Griffith AJ, Holt JR. (2013) TMC1 and TMC2 are components of the mechanotransduction channel in hair cells of the mammalian inner ear. *Neuron* 79, 504–515.
- Pan B, Askew C, Galvin A, Heman-Ackah S, Asai Y, Indzhykulian AA, Jodelka FM, Hastings ML, Lentz JJ, Vandenberghe LH, Holt JR, Géléoc GS. (2017) Gene therapy restores auditory and vestibular function in a mouse model of Usher syndrome type 1c. *Nat Biotechnol.* 35:264-272
- Pangrsic T1, 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.*; 13:869-76
- Pangrsic T, Reisinger E, Moser T. (2012) Otoferlin: a multi-C2 domain protein essential for hearing. *Trends Neurosci.*; 35:671-80
- Padmanarayana M1, Hams N, Speight LC, Petersson EJ, Mehl RA, Johnson CP (2014) Characterization of the Lipid Binding Properties of Otoferlin Reveals Specific Interactions between PI(4,5)P2 and the C2C and C2F Domains. *Biochemistry.* 53:5023-33
- Parsons TD, Sterling P (2003) Synaptic ribbon. Conveyor belt or safety belt? *Neuron* 37:379-382.
- 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.* 22:549-58
- Pickles JO, Comis SD, Osborne MP. (1984) Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. *Hear res.* 15:103-12
- Piper AK, Ross SE, Redpath GM, Lemckert FA, Woolger N, Bournazos A, Greer PA, Sutton RB, Cooper ST. (2017) Enzymatic cleavage of myoferlin releases a dual C2-domain module linked to ERK signalling. *Cell Signal.*; 33:30-40
- Pirvola U, Ylikoski J, Palgi J, Lehtonen E, Arumäe U, Saarna M. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 mRNAs in the peripheral target fields of developing inner ear ganglia. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9915–19
- Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, Dahlman JE, Parnas O, Eisenhaure TM, Jovanovic M, Graham DB, Jhunjhunwala S, Heidenreich M, Xavier RJ, Langer R, Anderson DG, Hacohen N, Regev A, Feng G, Sharp PA, Zhang F. (2014) CRISPR-Cas9 Knockin Mice for Genome Editing and Cancer Modeling. *Cell.*; 159:440-55
- 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 Ca<sup>2+</sup> Channels. *Cell.*; 102:89-97
- Poskanzer KE, Marek KW, Sweeney ST, Davis GW (2003) Synaptotagmin I is necessary for compensatory synaptic vesicle endocytosis in vivo. *Nature.* 426:559-63
- 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 U S A.*; 96:2435-8
- Randall A, Tsien RW. (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* 15:2995-3012

- 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.*, 284:1364-72
- 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.*; 289:8750-66
- Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS, Koonin EV, Sharp PA, Zhang F. (2015) In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 520:186-191.
- Rask-Andersen H, Liu W, Erixon E, Kinnefors A, Pfaller K, Schrott-Fischer A, Glueckert R. (2012) Human cochlea: anatomical characteristics and their relevance for cochlear implantation. *Anat Rec.* 295:1791-811
- Reich SJ, Auricchio A, Hildinger M, Glover E, Maguire AM, Wilson JM, Bennett J. (2003) Efficient trans-splicing in the retina expands the utility of adeno-associated virus as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther.*; 14:37-44
- Reiners J, Wolfrum U. (2006) Molecular analysis of the supramolecular usher protein complex in the retina. Harmonin as the key protein of the Usher syndrome. 572:349-53
- 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.*; 25:3037-48
- Redpath GM, Sophocleous RA, Turnbull L, Whitchurch CB, Cooper ST. (2015) Ferlins Show Tissue-Ferlins show tissue-specific expression and segregate as plasma membrane/late endosomal or trans-Golgi recycling ferlins. *Traffic.*; 17:245-66
- Reisinger, E., Bresee, C., Neef, J., Nair, R., Reuter, K., Bulankina, A., Nouvian, R., Koch, M., Bückers, J., Kastrop, L., Roux, I., Petit, C., Hell, S. W., Brose, N., Rhee, J.-S., Kügler, S., Brigande, J. V, and Moser, T. (2011) Probing the functional equivalence of otoferlin and synaptotagmin 1 in exocytosis. *J. Neurosci.* 31, 4886– 4895.
- Revelo NH, Kamin D, Truckenbrodt S, Wong AB, Reuter-Jessen K, Reisinger E, Moser T, Rizzoli SO. (2014) A new probe for super-resolution imaging of membranes elucidates trafficking pathways. *J Cell Biol.*; 205:591-606
- Rivera T, Sanz L, Camarero G, Varela-Nieto I, (2012). Drug delivery to the inner ear: strategies and their therapeutic implications for sensorineural hearing loss. *Curr. Drug Deliv.* 9, 231–242.
- Roberts W.M., Jacobs R.A. and Hudspeth A.J. (1990) Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. *J. Neurosci.*; 10: 3664-3684
- 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.
- 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.*; 127:277-89



- Rudolph S1, Tsai MC2, von Gersdorff H3, Wadiche JI4. (2015) The ubiquitous nature of multivesicular release. *Trends Neurosci.*; 38:428-38
- Ruel J, Wang J, Rebillard G, Eybalin M, Lloyd R, Pujol R, Puel JL (2007) Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex. *Hear Res.*; 227:19-27
- Ruel J, Emery S, Nouvian R, Bersot T, Amilhon B, Van Rybroek JM, Rebillard G, Lenoir M, Eybalin M, Delprat B, Sivakumaran TA, Giros B, El Mestikawy S, Moser T, Smith RJ, Lesperance MM, Puel JL. (2008) Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice. *Am J Hum Genet.*; 83:278-92
- Sacheli R, Delacroix L, Vandenackerveken P, Nguyen L, Malgrange B. (2013) Gene transfer in inner ear cells: a challenging race. *Gene Ther.* 20:237-47
- Safieddine S, Wenthold RJ. (1999) SNARE complex at the ribbon synapses of cochlear hair cells: analysis of synaptic vesicle- and synaptic membrane-associated proteins. *Eur J Neurosci.* 11:803-12
- Safieddine S, El-Amraoui A, Petit C (2012) The auditory hair cell ribbon synapse: from assembly to function. *Annu Rev Neurosci* 35:509-528.
- Sander JD, Joung JK. (2014) CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *J Control Release.* 219:237-247
- Scharinger A, Eckrich S, Vandael DH, Schönig 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 E3, Engel J, Striessnig J. (2015) Cell-type-specific tuning of Cav1.3 Ca<sup>2+</sup>-channels by a C-terminal automodulatory domain *Front Cell Neurosci.* 9:309
- Scheffer DI1, Shen J2, Corey DP3, Chen ZY4. (2015) Gene Expression by Mouse Inner Ear Hair cells during Development. *J Neurosci.*; 35:6366-80
- Schmitz F, Königstorfer A, Südhof TC. (2000) RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron*; 28:857-72
- Schnee ME1, 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.*; 70:326-38
- 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.*; 24:3372-80
- Schwander M, Kachar B, Muller U (2010) Review series: The cell biology of hearing. *J Cell Biol* 190:9-20.
- 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.
- Shao X, Fernandez I, Südhof TC, Rizo J. (1998) Solution structures of the Ca<sup>2+</sup>-free and Ca<sup>2+</sup>-bound C2A domain of synaptotagmin I: does Ca<sup>2+</sup> induce a conformational change? *Biochemistry.* 37:16106-15

Shen, Y., D. Yu, H. Hiel, P. Liao, D.T. Yue, P.A. Fuchs, and T.W. Soong. (2006). Alternative splicing of the Cav1.3 channel IQ domain, a molecular switch for Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation within auditory hair cells. *J. Neurosci.* 26:10690–10699.

Shibata SB, Ranum PT, Moteki H, Pan B, Goodwin AT, Goodman SS, Abbas PJ, Holt JR, Smith RJH. (2016) RNA Interference Prevents Autosomal-Dominant Hearing Loss. *Am J Hum Genet.* 98:1101-1113

Shpetner HS, Vallee RB. (1989) Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell.*; 59:421-32

Siegel JH, Brownell WE (1986) Synaptic and Golgi membrane recycling in cochlear hair cells. *J Neurocytol* 15:311–328. CrossRef Medline

Siegl G, Bates RC, Berns KI, Carter BJ, Kelly DC, Kurstak E, Tattersall P. (1985) Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology.* 23:61-73

Simms BA, Zamponi GW. (2014) Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron.*; 82:24-45

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.

Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. (2016) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science.* 351:84-8

Smith SM, Renden R, von Gersdorff H. (2008) Synaptic vesicle endocytosis: fast and slow modes of membrane retrieval. *Trends Neurosci.*; 31:559-68

Snellman J, Mehta B, Babai N, Bartoletti TM, Akmentin W, Francis A, Matthews G, Thoreson W, Zenisek D. (2011) Acute destruction of the synaptic ribbon reveals a role for the ribbon in vesicle priming. *Nat Neurosci.*; 14:1135-41

Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. (1993a) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature.*; 362:318-24

Soykan T, Kaempfer N, Sakaba T, Vollweider D, Goerdeler F, Puchkov D, Kononenko NL, Haucke V. (2017) Synaptic Vesicle Endocytosis Occurs on Multiple Timescales and Is Mediated by Formin-Dependent Actin Assembly. *Neuron.*, 93:854-66

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.

Spitzer MW, Semple MN. (1995) Neurons sensitive to interaural phase disparity in gerbil superior olive: diverse monaural and temporal response properties. *J Neurophysiol.*; 73:1668-90

Srivastava A., Lusby E.W., Berns K.I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome *J Virol* 45:555–564 .

Stöver T1, Yagi M, Raphael Y. (1999) Cochlear gene transfer: round window versus cochleostomy inoculation. *Hear Res.* 136:124-30

Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C. & Doudna, J. A. (2014) DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507, 62–67.

Strenzke N, Chakrabarti R, Al-Moyed H, Müller A, Hoch G, Pangrsic T, Yamanbaeva G, Lenz C, Pan KT, Auge E, Geiss-Friedlander R, Urlaub H, Brose N, Wichmann C, Reisinger E. (2016) Hair cell synaptic dysfunction, auditory fatigue and thermal sensitivity in otoferlin Ile515Thr mutants. *EMBO J.*; 35:2519-2535

Striessnig J. (1999) Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca(2+) channels. *Cell Physiol Biochem.* 9:242-69

Striessnig J, Pinggera A, Kaur G, Bock G, Tuluc P. (2014) L-type Ca<sup>2+</sup> channels in heart and brain. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal.* 3:15-38

Südhof TC (1995) The synaptic vesicle cycle : a cascade of protein-protein interactions. *Nature.*; 375:645-53

Südhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle *Annu Rev Neurosci* 27:509-27

Südhof TC, Rothman JE. (2009) membrane fusion : grappling with SNARE and SM proteins. *Science.*; 323:474-7

Summerford C, Samulski RJ. (1998) Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol.* 72:1438-45

Sutton RB, Davletov BA, Berghuis AM, Südhof TC, Sprang SR. (1995). Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-binding fold. *Cell* 80:929–38

Suzuki J, Hashimoto K, Xiao R, Vandenberghe LH, Liberman MC. (2017) Cochlear gene therapy with ancestral AAV in adult mice : complete transduction of inner hair cells without cochlear dysfunction. *Sci Rep.*; 7:46827

Tabebordbar M, Zhu K, Cheng JKW, Chew WL, Widrick JJ, Yan WX, Maesner C, Wu EY, Xiao R, Ran FA, Cong L, Zhang F, Vandenberghe LH, Church GM, Wagers AJ. (2016) In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science.* 351:407-411

Taberner AM, Liberman MC. 2005 Response properties of single auditory nerve fibers in the mouse. *J Neurophysiol.* 93:551-69

Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L. and De Camilli, P. (1996) The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J. Cell Biol.* 133, 1237–1250

Trapani I, Colella P, Sommella A, Iodice C, Cesi G, de Simone S, Marrocco E, Rossi S, Giunti M, Palfi A, Farrar GJ, Polishchuk R, Auricchio A. (2014) Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors. *EMBO Mol Med.*; 6:194-211

Trapani I, Auricchio A. (2018) Seeing the Light after 25 Years of Retinal Gene Therapy. *trends Mol Med.* 24:669-81

Tu Z, Yang W, Yan S, Guo X, Li XJ (2015) CRISPR/Cas9: a powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener.* 10:35

- Tuszynski MH, Yang JH, Barba D, U HS, Bakay RA, Pay MM, Masliah E, Conner JM, Kobalka P, Roy S, Nagahara AH., (2015) Nerve growth factor gene therapy: activation of neuronal responses in Alzheimer disease, *The JAMA Neurology*, 72:1139–1147.
- Ubach J, Zhang X, Shao X, Sudhof TC, Rizo J. (1998). Ca<sup>2+</sup> binding to synaptotagmin: how many Ca<sup>2+</sup> ions bind to the tip of a C2-domain ? *EMBO J.* 17:3921–30
- Uthaiiah RC, Hudspeth AJ (2010) Molecular anatomy of the hair cell's ribbon synapse. *J Neurosci* 30:12387-12399.
- Van Vliet KM1, Blouin V, Brument N, Agbandje-McKenna M, Snyder RO. (2008) The role of the adeno-associated virus capsid in gene transfer. *Methods Mol Biol.* 437:51-91
- Varga R, Avenarius MR, Kelley PM, Keats BJ, Berlin CI, Hood LJ, Morlet TG, Brashears SM, Starr A, Cohn ES, Smith RJ, Kimberling WJ. (2006) OTOF mutations revealed by genetic analysis of hearing loss families including a potential temperature sensitive auditory neuropathy allele. *J Med Genet.*; 43:576-81
- 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
- Vincent PF, Bouleau Y, Petit C, Dulon D. (2015) A synaptic F-actin network controls otoferlin-dependent exocytosis in auditory inner hair cells. *Elife.* e10988
- Vincent PF, Bouleau Y, Charpentier G, Emptoz A, Safieddine S, Petit C, Dulon D. (2017) Different CaV1.3 Channel Isoforms Control Distinct Components of the Synaptic Vesicle Cycle in Auditory Inner Hair Cells. *J Neurosci.*, 37:2960-2975
- Vincent PFY, Cho S, Tertrais M, Bouleau Y, von Gersdorff H and Dulon D (2018) *Cell Report, Sneak Peek* <https://ssrn.com/abstract=3257348>
- 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
- Vollrath L, Spiwoks-Becker I. (1996) Plasticity of retinal ribbon synapses. *Microsc Res Tech.* 35:472-87
- von Gersdorff H, Matthews G (1994a) Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals. *Nature.*367:735-9
- von Gersdorff H, Matthews G (1994b) Inhibition of endocytosis by elevated internal calcium in a synaptic terminal. *Nature.* 370:652-5.
- Vreugde S., Erven A., Kros C. J., Marcotti W., Fuchs H., Kurima K., Wilcox E. R., Friedman T. B., Griffith A. J., Balling R., Hrabé De Angelis M., Avraham K. B., Steel K. P., (2002) Beethoven, a mouse model for dominant, progressive hearing loss DFNA36. *Nat. Genet.* 30, 257–258.
- Wahl S, Katiyar R, Schmitz F. (2013) A Local, Periaxonal Endocytic Machinery at Photoreceptor Synapses in Close Vicinity to Synaptic Ribbons. *J Neurosci.* 33:10278-300
- Wang J, Puel JL (2018) Toward Cochlear Therapies. *Physiol Rev* 98:2477-2522

- Watanabe S, Liu Q, Davis MW, Hollopeter G, Thomas N, Jorgensen NB, Jorgensen EM. (2013a) Ultrafast endocytosis at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junctions. *Elife*. 2:e00723
- Watanabe S, Rost BR, Camacho-Pérez M, Davis MW, Söhl-Kielczynski B, Rosenmund C, Jorgensen EM (2013b) Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature* 504:242-47
- Watanabe S, Trimbuch T, Camacho-Pérez M, Rost BR, Brokowski B, Söhl-Kielczynski B, Felies A, Davis MW, Rosenmund C, Jorgensen EM. (2014) Clathrin regenerates synaptic vesicles from endosomes. *Nature*., 515:228-33
- Watanabe S and Boucrot E (2017) Fast and ultrafast endocytosis *Curr Opin Cell Biol*. 515:228-33
- Weisstaub N, Vetter DE, Elgoyhen AB, Katz E. (2002) The alpha9 alpha10 nicotinic acetylcholine receptor is permeable to and is modulated by divalent cations. *Hear Res*; 167:122–135.
- 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*. 32:9528-36
- Wichmann C, Moser T. (2015) Relating structure and function of inner hair cell ribbon synapses. *Cell Tissue Res*.; 361:95-114
- Wilson BS, and Dorman MF. (2008) Cochlear implants: A remarkable past and a brilliant future. *Hear. Res*. 242, 3-21.
- Wittig JH, Parsons TD. (2008) Synaptic ribbon enables temporal precision of hair cell afferent synapse by increasing the number of readily releasable vesicles: a modeling study. *J Neurophysiol*. 100:1724-39
- 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.
- Wu Z, Asokan A, Samulski RJ (2006) Adeno-associated virus serotypes: Vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14:316–327.
- Xia L, Yin S, Wang J. (2012) Inner ear gene transfection in neonatal mice using adeno-associated viral vector: a comparison of two approaches. *PLoS One*. 7:e43218
- Xu W, Lipscombe D. (2001) Neuronal Ca(V)1.3alpha(1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci*. 21:5944-51
- Xue M, Ma C, Craig TK, Rosenmund C, Rizo J. (2008) The Janus-faced nature of the C(2)B domain is fundamental for synaptotagmin-1 function. *Nat Struct Mol Biol*. , 15:1160-8
- Yang P.S., Alseikhan B.A., Hiel H., Grant L., Mori M.X., Yang W., Fuchs P.A., Yue D.T. 2006. Switching of Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of Cav1.3 channels by calcium binding proteins of auditory hair cells. *J. Neurosci*. 26:10677–10689
- Yao J, Kwon SE, Gaffaney JD, Dunning FM, Chapman ER. (2012) Uncoupling the roles of synaptotagmin I during endo- and exocytosis of synaptic vesicles. *Nat Neurosci*. 15:243-9

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.

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.

Yu W, Wu Z. (2018) In Vivo Applications of CRISPR-Based Genome Editing in the Retina. *Front Cell Dev Biol.* 6:53

Zhang, J.Z., Davletov, B.A., Südhof, T.C. & Anderson, R.G. (1994) Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling. *Cell* 78, 751–760.

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.

Zhou W, Jones SW (1996) The effects of external pH on calcium channel currents in bullfrog sympathetic neurons. *Biophys J* 70:1326-1334.

Zhou Q, Lai Y, Bacaj T, Zhao M, Lyubimov AY, Uervirojnangkoorn M, Zeldin OB, Brewster AS, Sauter NK, Cohen AE, Soltis SM, Alonso-Mori R, Chollet M, Lemke HT, Pfuetzner RA, Choi UB, Weis WI, Diao J, Südhof TC, Brunger AT. (2015) Architecture of the synaptotagmin-SNARE machinery for neuronal exocytosis. *Nature.* 525:62-7

Zinn E, Pacouret S, Khaychuk V, Turunen HT, Carvalho LS, Andres-Mateos E, Shah S, Shelke R, Maurer AC, Plovie E, Xiao R, Vandenberghe LH. (2015) In silico reconstruction of the viral evolutionary lineage yields a potent gene therapy vector. *Cell Rep.* 12, 1056–1068.