



HAL
open science

Bases moléculaires de la physiopathologie de la voie de signalisation de la polarité planaire dépendante des protéines Gi

Stéphanie Mauriac

► **To cite this version:**

Stéphanie Mauriac. Bases moléculaires de la physiopathologie de la voie de signalisation de la polarité planaire dépendante des protéines Gi. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0080 . tel-03264172

HAL Id: tel-03264172

<https://theses.hal.science/tel-03264172>

Submitted on 18 Jun 2021

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 BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Bases moléculaires de la physiopathologie de la voie de signalisation de la polarité planaire dépendante des protéines Gi

Par **Stéphanie Alexia MAURIAC**

Sous la direction du Dr. Mireille MONTCOUQUIOL

Soutenue publiquement le 17 Juin 2019

Membres du jury :

Dr. Didier DULON	Université de Bordeaux	Président
Pr. Aziz EI-AMRAOUI	Institut Pasteur à Paris	Rapporteur
Pr. Brigitte MALGRANGE	Université de Liège	Rapporteuse
Pr. Jean-Paul BORG	Université Aix Marseille	Examineur
Dr. Karine MASSE	Université de Bordeaux	Examinatrice
Dr. Mireille MONTCOUQUIOL	Université de Bordeaux	Directrice de thèse

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	5
ABREVIATIONS	9
RESUME / ABSTRACT	13
INTRODUCTION	16
Chapitre I : La polarité cellulaire	17
A. Définitions et généralités sur la polarité	17
B. La polarité Droite-Gauche (D-G)	17
C. La polarité Apico-Basale (A-B)	18
1. Le complexe Par	19
a. Découverte du complexe Par chez les invertébrés	19
b. Complexe Par chez les mammifères	20
• Par6	20
• Par3	20
• aPKC	20
2. Le complexe Crumbs	21
a. Découverte du complexe Crumbs chez les invertébrés	21
b. Complexe Crumbs chez les mammifères	21
• Crumbs	21
• Pals1	22
• Patj	22
• Mpdz/Mupp1	23
3. Le complexe Scribble, Lgl, Dlg	23
a. Découverte chez les invertébrés	23
b. Complexe Scribble, Lgl, Dlg chez les mammifères	24
4. Mécanismes moléculaires permettant la mise en place de la polarité A-B	24
D. Polarité Cellulaire Planaire centrale (PCP) ou polarité dans le plan (core PCP)	26
1. Définitions	26
2. La PCP chez les invertébrés	26
a. Protéines centrales de la PCP chez les invertébrés	27
• Starry Night/Flamingo (Fmi)	27
• Frizzled (Fz)	28
• Strabismus/Van Gogh (Stbm/Vang)	28
• Prickle (Pk)	28
• Dishevelled (Dvl/Dsh)	28
• Diego (Dgo)	28
b. Distribution asymétrique des protéines centrales de la PCP	29
c. Régulation du cytosquelette par les protéines centrales de la PCP	31
d. PCP autonome et non autonome	31
3. PCP chez les vertébrés et les mammifères	33
a. PCP et Extension/Convergente (EC)	33
b. Gènes et protéines centrales de la PCP chez les mammifères : l'oreille interne	34

c.	Protéines associées à la PCP	39
4.	Une autre voie de signalisation de la PCP : Division asymétrique et fonction post-mitotique	40
a.	La machinerie derrière la division asymétrique chez les invertébrés	41
•	La première division du <i>C. elegans</i>	42
•	Division des neuroblastes chez la drosophile	42
b.	La machinerie derrière la division asymétrique chez les vertébrés et les mammifères	43
•	Cellules épithéliales de la peau	43
•	Division neuronale	43
Chapitre II : Le système auditif		50
A.	Définitions et généralités	50
B.	Oreille externe	50
C.	Oreille moyenne	51
D.	Oreille interne	51
1.	Le système Vestibulaire	51
a.	Canaux semi-circulaires	52
b.	Sacculé et Utricule	52
2.	Le système cochléaire ou cochlée	53
a.	Organisation fonctionnelle	53
b.	Organe de Corti	54
•	Développement embryonnaire	55
<i>Différenciation du domaine prosensoriel</i>	55	
<i>Mécanisme d'Extension/Convergente (EC)</i>	56	
<i>Mise en place de l'axe de la PCP</i>	57	
•	Développement, morphologie et fonction de la touffe ciliaire	58
<i>Organisation structurelle de la touffe ciliaire</i>	58	
<i>La mécanotransduction</i>	59	
<i>Tip-complex, élongation et maintien de la longueur des stéréocils</i>	60	
•	Caractéristiques morpho-fonctionnelles des CC et des CS	64
<i>Les Cellules Ciliées Internes (CCI)</i>	64	
<i>Les Cellules Ciliées Externes (CCE)</i>	65	
<i>Les Cellules de soutien (CS)</i>	65	
E.	Caractéristiques d'un son	67
1.	Le spectre auditif	67
2.	La tonotopie de l'organe de Corti :	67
3.	Les voies auditives	68
a.	Le noyau cochléaire	68
b.	Le complexe olivaire supérieur	69
c.	Le colliculus inférieur	69
d.	Corps genouillé médian	69
F.	Surdités	69
Chapitre III : Le système nerveux central		72
A.	Définitions et généralités	72
B.	Développement et migration neuronale	72
1.	Migration radiale pour les neurones excitateurs du cortex	72
2.	Migration tangentielle et radiale pour les neurones inhibiteurs du cortex	75
C.	Les gènes de polarité dans le développement du Système nerveux central (SNC)	75
D.	Déficits et pathologies associées à des mutations précoces	77
1.	Développement et pathologies associées à des malformations du corps calleux	77
2.	Hétérotopies, lissencéphalies, polymicrogyries et microcéphalie	79
3.	Hydrocéphalies	80
Chapitre IV : Le Chudley McCullough Syndrome (CMCS)		83

A.	La pathologie	83
B.	Modèles murins pour <i>Gpsm2</i> et <i>Gnai3</i>	85
OBJECTIFS		88
A.	Etablir la fonction du complexe <i>Gpsm2/Gai3</i> sur le système auditif et cérébral	89
1.	Identification de la fonction du complexe <i>Gpsm2/Gai3</i> sur la fonction auditive	89
2.	Identification de la fonction du complexe <i>Gpsm2/Gai3</i> au niveau cérébral	89
3.	Identification des bases moléculaires du CMCS	89
4.	Identification d'une nouvelle fonction moléculaire pour le complexe <i>Gpsm2/Gai3</i>	90
B.	Découverte des protéines impliquées dans le recrutement/maintien des protéines <i>Gpsm2/Gai3</i> à la surface apicale des CC	90
1.	Identification du profil d'expression des protéines du complexe Crumbs	91
2.	Découverte des liens moléculaires entre les protéines du complexe Crumbs et <i>Gpsm2/Gai3</i>	91
3.	Identification des déficits morphologiques et fonctionnels des souris <i>Mpdz^{Foxg1}</i>	91
4.	Analyse structurelle du cerveau chez les souris <i>Mpdz^{Emx1}</i>	92
RESULTATS		93
Article 1 :		95
	Introduction	96
	Résultats	96
	Conclusion	96
Article 2 :		122
	Introduction	123
	Résultats	123
	Conclusion	123
RESULTATS COMPLEMENTAIRES		161
	Introduction	163
	Objectifs	164
	Matériels & Méthodes	164
	Résultats	166
	Conclusion	169
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		178
A.	<i>Gpsm2</i> : une protéine critique pour la polarité, la maturation et la fonction de la CC	179
1.	Rôle de <i>Gpsm2</i> dans la maturation apicale de la CC	179
2.	Découverte d'une nouvelle fonction et d'un nouveau partenaire pour <i>Gpsm2</i> : La Whirlin	184
3.	<i>Gpsm2</i> : une protéine nécessaire à la fonction synaptique de la CC et au développement du ganglion spiral	185
4.	Perspectives thérapeutiques	187
B.	<i>Gpsm2</i> : une protéine importante dans la maturation du système nerveux central	189
1.	<i>Gpsm2</i> affecte la neurogénèse et la motilité neuronale	189
2.	<i>Gpsm2</i> et troubles cognitifs	190
C.	Le complexe Crumbs et le système auditif	191
1.	Un complexe Crumbs3/Pals1/ <i>Mpdz</i> à la surface apicale de la CC ?	191
2.	La mutation de <i>Mpdz/Mupp1</i> semble affecter la maturation des CC et leur fonction	192
D.	Rôle de <i>Mpdz</i> au niveau cérébral	194
E.	Daple : le lien entre <i>Gpsm2</i> et <i>Mpdz</i> ?	194
F.	Conclusion générale	196

REFERENCES

197

ANNEXES

217

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier le **Pr Aziz EL-AMRAOUI** et le **Pr Brigitte MALGRANGE** pour avoir accepté de lire et d'expertiser mon travail de thèse, le **Pr Jean-Paul BORG** et le **Dr Karine MASSE** pour avoir accepté d'être examinateurs dans ce jury de thèse, et le **Dr Didier DULON** pour avoir accepté d'être le président de ce jury de thèse.

Je souhaite remercier tout particulièrement le **Dr Mireille MONTCOUQUIOL** et le **Dr Nathalie SANS** sans qui cette aventure n'aurait jamais vu le jour.

Merci à **Mireille**, ma directrice de thèse, pour m'avoir supervisée, conseillée, soutenue et guidée vers le bon chemin tout au long de ces années. Merci pour ses nombreuses heures de relecture et de correction de ce manuscrit. Merci de m'avoir donné la passion de cet organe extraordinaire qu'est l'oreille interne. Je mesure la chance d'avoir eu l'opportunité de travailler avec elle, merci pour tout !

Merci à **Nathalie, mon autre chef**, pour toutes ces heures passées à m'apprendre les bases de la biochimie et de la biologie moléculaire. Merci pour son soutien et tous ses conseils avisés qui m'ont permis d'avancer pendant ces quatre années.

Merci à mes enseignants de la Cajal School (« Developmental Neurobiology and pathologies »), le **Dr Paolo GIACOBINI** et le **Dr Emilie PACARY** pour m'avoir enseigné des techniques de pointes telles que l'électroporation *in utero* et la technique de transposition iDISCO.

Merci au **Dr Didier DULON**, à **Thibault PEINEAU**, et à **Margot TETRAIS** pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire pour y découvrir les tests auditifs et les injections intra-cochléaires sur la souris.

Merci à **Maité** (Alias : « Wonderwoman ») pour sa présence, son soutien, ses conseils, nos heures en chirurgie et nos discussions scientifiques (ou non !). Sa présence pendant toutes ces années est d'une valeur inestimable.

Merci à **Jérôme** pour son soutien, son aide, et ses conseils avisés. Merci pour ces pauses café qui m'ont grandement aidé.

Merci à **Nathalie A.** pour sa gentillesse, sa bonne humeur à toute épreuve et son aide sur cette dernière ligne droite. C'est une personne formidable avec le cœur sur la main, je n'oublierai jamais son aide !

Merci à **Esther** pour son aide et ses conseils. J'ai beaucoup apprécié travailler avec elle sur notre papier.

Merci à **Anne**, pour sa douceur, ses connaissances sans limite qui me rendent admirative, ses chansons de Disney chantées avec douceur qui berçaient nos repas, sans oublier ses talents d'imitateur qui me donnaient le sourire en toutes circonstances (« Vous z'en voulez encore... »). Merci pour son soutien, son amitié sincère et son aide dans les nombreuses relectures de ce manuscrit.

Merci à **Jennifer** pour son soutien, nos heures de bavardage, nos courses nocturnes, et sa compréhension dans mes moments de doute et de panique (surtout quand on renverse un café sur son ordi tout neuf en plein milieu de l'écrit de son manuscrit de thèse, ce fut le café le plus cher au monde...), à nos heures passées à faire des gradients de sucrose et des PSD dans la chambre froide. Merci pour cette magnifique amitié !

Merci à **Ana** pour toutes ces longues heures de discussion, d'entraide et de soutien sans limite, et bien sur nos moments de détente au P'tit Quebec ! Sa bonne humeur et sa façon de voir la vie me manqueront.

Merci à **Isabelle** pour son aide au quotidien, nos arrangements en culture cellulaire et nos séances de sport après le travail qui m'ont beaucoup aidé.

Merci à **Ronan** pour sa bonne humeur, son humour et son aide sur de nombreux projets.

Merci à **Jean-Michel** de m'avoir enseigné et communiqué sa passion pour la biochimie.

Merci à **Ben, Mehdi et Steve**, mes coéquipiers de tâche commune, pour leur aide et leurs disponibilités au quotidien.

Merci à **Camille** pour son soutien, sa grande écoute et sa confiance.

Merci à **Chantal** de m'avoir pris sous son aile pendant mes débuts.

Merci à **Noémie** pour m'avoir longuement expliqué ses reconstructions devant lesquelles je suis admirative.

Merci à **Maureen** pour sa contribution à ce projet et sa bonne humeur.

Merci à **Shri** pour sa motivation et son aide sur ce projet.

Je souhaite aussi remercier tous les anciens et nouveaux membres de mon équipe qui ont participé de près ou de loin à ce projet : Angelina, Anthony, Arnaldo, Jeanne, Julie, Nancy, Sybille, Valoris, Yann, ...

Merci à **mes amis « hors-thèse »** pour votre présence au quotidien et les nombreux moments passés ensemble qui m'ont permis de m'oxygéner.

Merci à **Manon**, pour son amitié sincère, ses encouragements, son soutien, nos heures de rigolades et de discussions scientifiques (ou non !). Même à l'autre bout du monde on n'a pas réussi à nous éloigner !

Un merci tout particulier à ma famille pour m'avoir toujours soutenue, encouragée et conseillée. Sans votre aide, rien n'aurait été possible. Merci à **mes parents** de m'avoir transmis leur force et leur motivation qui m'ont été indispensables dans la réalisation de ce projet. Merci à ma sœur pour ses encouragements qui ont été d'un soutien inestimable. Merci à mes deux amours, **Adrien** et **Florent**, qui ont été capables de me redonner le sourire en toute circonstance. Merci à mon beau-frère **Cédric** pour son soutien considérable. Merci à mes **grands-parents, oncles** et **tantes** pour leur écoute et leur soutien. Merci à toi aussi **mamie Huguette** qui est partie malheureusement trop tôt, au tout début de cette aventure... Sans oublier **Alexandre**, mon conjoint, mon ami, mon confident à toute épreuve. Je mesure la chance de l'avoir au quotidien à mes côtés. Les mots me manquent pour dire à quel point il a été indispensable pour moi dans cette aventure !

Publications scientifiques

COMMUNICATIONS ORALES

S. A. Mauriac - Identification of a common molecular mechanism leading to hearing deficit and corpus callosum agenesis in rare disease – “Hottopics” séminaire du Neurocentre Magendie (Bordeaux – France, **30 Mai 2018**).

ARTICLES SCIENTIFIQUES

S. A. Mauriac*, Y. E. Hien*, J. Bird, S. Dos-Santos Carvalho, R. Peyroutou, S. C. Lee, M. M. Moreau, J-M. Blanc, A. Geyser, C. Medina, O. Thoumine, S. Beer-Hammer, T. Friedman, L. Rüttiger, A. Forge, B. Nürnberg[#], N. Sans[#], and M. Montcouquiol[#]. **2017**. Defective Gpsm2/Gα_{i3} signaling disrupts stereocilia development in Chudley McCullough syndrome. *Nature Communication*. 2017 Apr 7;8:14907. doi: 10.1038/ncomms14907.

S. Beer-Hammer, S. C. Lee, **S. A. Mauriac**, V. Leiss, I. A. M. Groh, A. Novakovic, R. Piekorz, K. Bucher, C. Chen, K. Ni, K. Rohbock, C. Harasztosi, T. Schimmang, U. Zimmermann, K. Pfeiffer, L. Birnbaumer, A. Forge, M. Montcouquiol, M. Knipper, B. Nürnberg, and L. Rüttiger. **2018**. G_{oi} proteins are indispensable for hearing. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;47(4):1509-1532. doi: 10.1159/000490867. Epub 2018 Jun 21.

COMMUNICATIONS AUX CONGRES

S. A. Mauriac, E. Y. Hien, J. Bird, A. Geyzer, R. Peyroutou, M. Decroo, C. Medina, S. Carvalho, T. Friedman, A. Forge, B. Nurnberg, N. Sans, M. Montcouquiol. Stereocilia and filopodia elongation : 2 structures, one original mechanism. Symposium du Neurocentre Magendie (Bordeaux - France, **26 - 27 Novembre 2015**).

E. Y. Hien, **S. A. Mauriac**, J. Bird, A. Geyzer, R. Peyroutou, M. Decroo, C. Medina, S. Carvalho, T. Friedman, A. Forge, B. Nurnberg, N. Sans, M. Montcouquiol. Stereocilia and filopodia elongation : 2 structures, one original mechanism. Symposium du Neurocentre Magendie (Bordeaux - France, **26 - 27 Novembre 2015**).

S. A. Mauriac, E. Y. Hien, J. Bird, A. Geyzer, R. Peyroutou, M. Decroo, C. Medina, S. Carvalho, T. Friedman, A. Forge, B. Nurnberg, N. Sans, M. Montcouquiol. Identification of the molecular mechanism behind the Chudley McCullough Syndrome reveals new function for the Gpsm2/Gα_{i3} complex in actin regulation. Journée de l'Ecole Doctorale de Bordeaux (Bordeaux - France, **6 avril 2016**).

S. A. Mauriac, E. Y. Hien, J. Bird, A. Geysler, R. Peyroutou, M. Decroo, C. Medina, S. Carvalho, T. Friedman, A. Forge, B. Nurnberg, N. Sans, M. Montcouquiol. Identification of the molecular mechanism behind the Chudley McCullough Syndrome reveals new function for the Gpsm2/G α_{i3} complex in actin regulation. Neurocampus day (Bordeaux - France, **4 novembre 2016**).

S. A. Mauriac, Y. E. Hien, J. Bird, S. Dos-Santos Carvalho, R. Peyroutou, S. Chim Lee, M. M. Moreau, J.-M. Blanc, A. Geysler, C. Medina, O. Thoumine, S. Beer-Hammer, T. Friedman, L. Rüttiger, A. Forge, B. Nürnberg, N. Sans, and M. Montcouquiol. Defective Gpsm2/G α_{i3} signaling disrupts stereocilia development in Chudley McCullough syndrome. Bordeaux Cell Biology Gathering (BCBG) Day (Bordeaux - France, **4 avril 2017**).

S. A. Mauriac, Y. E. Hien, J. Bird, S. Dos-Santos Carvalho, R. Peyroutou, S. Chim Lee, M. M. Moreau, J.-M. Blanc, A. Geysler, C. Medina, O. Thoumine, S. Beer-Hammer, T. Friedman, L. Rüttiger, A. Forge, B. Nürnberg, N. Sans, and M. Montcouquiol. Defective Gpsm2/G α_{i3} signaling disrupts stereocilia development in Chudley McCullough syndrome. Neurocampus day (Bordeaux - France, **5 avril 2017**) – Journée de l'Ecole Doctorale de Bordeaux (Bordeaux - France, **12 avril 2017**)

S. A. Mauriac, Y. E. Hien, J. Bird, S. Dos-Santos Carvalho, R. Peyroutou, S. Chim Lee, M. M. Moreau, J.-M. Blanc, A. Geysler, C. Medina, O. Thoumine, S. Beer-Hammer, T. Friedman, L. Rüttiger, A. Forge, B. Nürnberg, N. Sans, and M. Montcouquiol. Defective Gpsm2/G α_{i3} signaling disrupts stereocilia development in Chudley McCullough syndrome. Symposium du Neurocentre Magendie (Bordeaux - France, **13 - 14 avril 2017**).

S. A. Mauriac, Y. E. Hien, J. Bird, R. Peyroutou, S. Chim Lee, M. M. Moreau, J.-M. Blanc, A. Geysler, C. Medina, O. Thoumine, S. Beer-Hammer, T. Friedman, L. Rüttiger, A. Forge, B. Nürnberg, N. Sans, and M. Montcouquiol. Defective Gpsm2/G α_{i3} signaling disrupts stereocilia development in Chudley McCullough syndrome. NeuroFrance 2017 (Bordeaux - France, **17 - 19 mai 2017**).

Y. E. Hien, **S. A. Mauriac**, S. Dos-Santos Carvalho, R. Peyroutou, J.-M. Blanc, C. Medina, O. Thoumine, S. Beer-Hammer, B. Nürnberg, N. Sans, and M. Montcouquiol. Defective Gpsm2/G α_{i3} signaling disrupts stereocilia development in Chudley McCullough syndrome. NeuroFrance 2017 (Bordeaux - France, **17 - 19 mai 2017**).

S. A. Mauriac, Y. E. Hien, J. Bird, R. Peyroutou, S. Chim Lee, M. M. Moreau, J.-M. Blanc, A. Geysler, C. Medina, O. Thoumine, S. Beer-Hammer, T. Friedman, L. Rüttiger, A. Forge, B. Nürnberg, N. Sans, and M. Montcouquiol. Defective Gpsm2/Gα_{i3} signaling disrupts stereocilia development in Chudley McCullough syndrome. 54th Workshop in Inner Ear Biology (Hanovre – Germany, **13 - 16 Septembre 2017**).

S. A. Mauriac, Y. E. Hien, J. Bird, R. Peyroutou, S. Chim Lee, M. M. Moreau, J.-M. Blanc, A. Geysler, C. Medina, O. Thoumine, S. Beer-Hammer, T. Friedman, L. Rüttiger, A. Forge, B. Nürnberg, N. Sans and M. Montcouquiol. *Discovery of a molecular mechanism involved in a rare pathology and rescue of hearing loss*. Symposium du Neurocentre Magendie (Bordeaux - France, **26 - 27 avril 2018**).

S. Dos-Santos-Carvalho, Y. E. Hien, **S. A. Mauriac**, N. Aubailly, R. Peyroutou, C. Landmann, N. Piguel, J. Stanic, D. Henderson, N. Sans, O. Thoumine and M. Montcouquiol. Vangl2 controls N-cadherin nanocluster density and neuronal outgrowth. Symposium du Neurocentre Magendie (Bordeaux - France, **26 - 27 avril 2018**).

S. A. Mauriac, Y. E. Hien, J. Bird, R. Peyroutou, S. Chim Lee, M. M. Moreau, J.-M. Blanc, A. Geysler, C. Medina, O. Thoumine, S. Beer-Hammer, T. Friedman, L. Rüttiger, A. Forge, B. Nürnberg, N. Sans, and M. Montcouquiol. *Identification of a common molecular mechanism leading to hearing deficit and corpus callosum agenesis in rare disease*. Molecular Biology of hearing and deafness. MBHD meeting (Göttingen - Germany, **16 - 19 Mai 2018**).

S. A. Mauriac, Y. E. Hien, J. Bird, R. Peyroutou, S. Chim Lee, M. M. Moreau, J.-M. Blanc, A. Geysler, C. Medina, O. Thoumine, S. Beer-Hammer, T. Friedman, L. Rüttiger, A. Forge, B. Nürnberg, N. Sans and M. Montcouquiol. *Identification of a common molecular mechanism leading to hearing deficit and corpus callosum agenesis in rare disease*. Molecular Biology of hearing and deafness. 11th FENS forum des Neuroscience (Berlin - Germany, **7 - 11 Juillet 2018**).

Abréviations

A-B: Apico-Basal
A-P : Antéro-Postérieur
ABR: Auditory Brainstem Response
Actine-F : Actine Filamenteuse
Actine-G : Actine Glomérulaire
Afadine Actin Filament binding protein
AJ : Adherents Junctions ou jonctions adhérentes
ANK : Ankyrin repeat domain
aPKC : atypic Protein Kinase C
aRGC : apical Radial Glia Cell ou Cellule de la Glie Radiaire apicale
Brat : Brain tumor
bRGC : basal Radiale Glia Cell ou Cellule de la Glie radiaire basale
BSA : Bovine Serum Albumin ou Albumine de Sérum Bovin
C. elegans : Caenorhabditis elegans
CamKII : Ca²⁺ Calmodulin dependante Kinase II
CC : Cellule Ciliée
CCE : Cellule Ciliée Externe
CCI : Cellule Ciliée Interne
Cdc42 : Cell division Control 42
Celsr : Cadherin EGF LAG Seven-pass G-type Receptor
CP : Cortical Plate ou Plaque Corticale
CR : Complement Receptor domain
CS : Cellule de Soutien
D-G : Droite-Gauche
D-V : Dorso-Ventral
Daple : Dvl1-Associating Proteins with a high frequency of Leucine
dB : Décibels
DEP : Dishevelled EGL10 Plechstrin
Dgo : Diego
dInsc : Drosophila Inscuteable
DIX : Dishevelled Axin
DLG : Discs Large
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPOAE : Distortion Product OtoAcoustic Emission
DRok : Drosophila Rho associated Kinase
Dvl/Dsh : Dishevelled
E : stade Embryonnaire
EC : Extension/Convergente
EML1 : Echinoderm Microtubule-associated protein Like 1
ENU : N-Ethyl-N-Nitroso-Urea
Eps8L2 : Epidermal growth factor receptor Pathway Substrate 8 Like 2
FBM : Facial Branchiomotor ou branchiomoteur du visage
FERM : F pour 4.1 protein, E pour Ezrin, R pour Radixin et M pour Moesin
Fmi : Starry Night/Flamingo
Fz : Frizzled
G α i : Heterotrimeric G alpha i
Gnai : Gène codant pour les protéines G α i
GOA / GPA: Guanine nucleotide-binding protein
GPR: G Protein regulator
GUK : GUanylate Kinase
HNL : Harmonin N like

Hz : Hertz
IGG : indusium Griseum Glia
Insc : Inscuteable
IPC : Intermediate Progenitor Cell ou Cellule Progénitrice Intermédiaire
IQ : Calmodulin binding motif
IZ : Intermediate Zone ou Zone Intermédiaire
JAM : Junctional Adhesion Molecules
KO : Knock-Out
LCR : liquide céphalorachidien
Lgl : Lethal Giant Larvae
LGN : Leucine-Glycine-Asparagine repeats
LIN-5 : Abnormal cell linéale-5
LP : Loop tail
MDCK : Madin-Darby-Canine-Kidney Cells
MG : Midline Glia ou ligne médiane
MGE / CGE : Eminences Ganglionnaires Médiales ou Caudales
mInsc : Mammalian Inscuteable
Mira : Miranda
Mpdz/Mupp1 : Multiple PDZ domaine protein
mPins : Mammalian Partner of Inscuteable
MPP5 : Membrane-associated Palmytoylated Protein 5
Mud : Mushroom body defective
Mwh : Multiple Wing Hair
Myo15 : Myosine 15
MyTh4 : MYosin Tail Homology 4
MZ : Marginal Zone ou Zone Marginale
NMDAR : N-Methyl-D-Aspartate receptor
NuMA : Nuclear Mitotic Aparratus protein
P : stade Post natal
P-D : Proximo-distal
Pals1 : Protein Associated With Lin7 1
Par : Partition défective
Patj : Pals1-Associated Tight Junction
PB1 : Phox/Bem1 domain
PBS : Phosphate-buffered saline
PCP : Polarité Cellulaire Planaire
PDZ : Post Synaptic Density protein 95 (PSD95) – Drosophila disc Large tumor suppressor (Dlg1) – Zonula occludens-1 (ZO-1)
PDZBD : PDZ Binding Domain
PEA : Potentiels Evoqués Auditifs
PEI : Polyethylenimine
PH : Pleckstrin Homology domain
Pk : Prickle
PKC-3 : Protéine Kinase C like 3
Pros : Prospero
Scrib : Scribble
Sdt : Stardust
Semi-CRIB : Cdc42/Rac Interaction Binding domain
sFRP : Secreted Frizzled Related Protein
SH3 : Src Homology 3
SNC : Système Nerveux Central

SP : Subplate ou sous plaque
SVZ : Subventricular Zone ou Zone Sousventriculaire
SynGAP : Synaptic - GTPase Activating Protein
TJ : Tight Junction ou jonction serrée
TPR : Tetratricopeptide Repeat
Vang/Stbm : Van Gogh/Strabismus
Vangl : Van gogh like
vGLUT1 : Vesicular Glutamate Transporter 1
VZ : Ventricular Zone ou zone ventriculaire
WDR81 : WD Repeat-containing proteins 81
ZA : Zonula Adherens
ZO : Zonula Occludens

Résumé / Abstract

Bases moléculaires de la physiopathologie de la voie de signalisation de la polarité planaire dépendante des protéines Gi

La perte auditive est le trouble sensoriel le plus commun avec 40% des personnes de plus de 65 ans affectées, entraînant, chez ces patients une dégradation de leur qualité de vie et un isolement sociale. Les principales causes sont le vieillissement ou l'exposition au bruit, mais les mutations génétiques sont aussi à l'origine de déficits auditifs. Parmi ces surdités, le Syndrome de Chudley McCullough (CMCS) est une maladie rare caractérisée par une surdité sévère et précoce associée à des anomalies cérébrales (Chudley et al., 1997). Récemment, des mutations du gène *GPSM2* (G protein signaling modulator 2) ont été décrites comme étant responsables de cette pathologie sans que l'on en connaisse les mécanismes (Walsh et al., 2010). A l'aide d'un modèle d'étude murin de cette pathologie, nous avons identifié les bases moléculaires de la pathologie ainsi qu'une nouvelle fonction moléculaire pour *Gpsm2* sur la modulation du cytosquelette d'actine. La perturbation de cette fonction affecte à la fois la maturation des cellules auditives et la croissance des jeunes neurones, pouvant expliquer les surdités et l'hypoplasie du corps calleux décrits chez ces patients (Mauriac et al., 2017). De plus, nous avons identifié les partenaires de *Gpsm2*, les protéines *Gai*, comme indispensables à la fonction auditive (Beer-Hammer et al., 2018). Au niveau moléculaire, nous avons découvert une nouvelle interaction de *Gpsm2* avec une protéine essentielle à la maturation des cellules auditives et impliquées dans les surdités de type Usher, la *Whirlin*.

Par conséquent, notre étude a permis de clarifier l'étiologie du CMCS et de montrer que sa complexité et son aspect multisyndromique sont dus au rôle multifonctionnel du complexe *Gpsm2/Gai* non seulement sur la dynamique de la tubuline dans des cellules en prolifération et en post-mitotiques (Ezan et al., 2013), mais aussi sur la dynamique d'actine (Mauriac et al., 2017).

Mots clés : Polarité, *Gpsm2*, Cytosquelette, Pathologie rare, Cochlée, Corps calleux.

Molecular basis of the physiopathology of the planar cell polarity signaling pathway depending on Gi proteins

Hearing loss is the most common sensory disorder, affecting 40% of people over 65 years old, leading for these patients, to the deterioration of their quality of life and to their social isolation. The main causes are aging or exposure to noise. However, many genes can also cause deafness. Among these deafnesses, the Chudley McCullough Syndrome (CMCS) is a rare disease characterized by severe and early deafness associated with brain abnormalities (Chudley et al., 1997). Recently, mutations in the GPSM2 (G protein signaling modulator 2) gene were found to be causative of this pathology, but the molecular basis were unknown (Walsh et al., 2010). Using a murine model of this pathology, we identified the molecular basis of this pathology as well as a new molecular function for Gpsm2 on the modulation of actin cytoskeleton. The disruption of this function leads to defect of the maturation of auditory hair cells and the reduction of the outgrowth of young neurons which may explain the deafness and the hypoplasia of the corpus callosum described in these patients (Mauriac et al., 2017). In addition, we identified partners of Gpsm2, Gai proteins, as essential for auditory function (Beer-Hammer et al., 2018). At the molecular level, we have discovered a new interaction of Gpsm2 with a protein essential for the maturation of auditory cells and involved in Usher type deafness, Whirlin.

Therefore, our study clarified the etiology of CMCS and show that the complexity and multisyndromic aspect of this pathology is due to the multifunctional role of the complex Gpsm2/Gai not only on tubulin dynamics in proliferating cells and post-mitotic cells (Ezan et al., 2013), but also on actin dynamics (Mauriac et al., 2017).

Keywords : Polarity, Gpsm2, Cytoskeleton, Rare disease, Cochlea, Corpus callosum.

Introduction

Chapitre I : La polarité cellulaire

A. Définitions et généralités sur la polarité

Les mammifères, comme l'ensemble des organismes pluricellulaires, sont des organismes polarisés. Afin d'orienter l'organisme dans l'espace, on définit trois axes de polarité externe :

- L'axe Antéro-Postérieur ;
- L'axe Dorso-Ventral ;
- L'axe Droite-Gauche.

La polarité externe est facile à déterminer et fait souvent référence à des axes de symétrie. Mais ce n'est pas aussi simple lorsqu'on parle de polarité interne. En effet, pour des organes, des tissus ou même des cellules, les axes de polarité sont plus difficiles à déterminer. C'est dans ces conditions que la notion de polarité prend tout son sens. On la définit comme une absence de symétrie dans le plan de l'organisme. Les différentes polarités nécessaires à l'établissement de l'organisme sont les suivantes :

- La polarité Droite-Gauche (D-G) ;
- La polarité Apico-Basale (A-B) ;
- Et la Polarité Cellulaire Planaire (PCP).

B. La polarité Droite-Gauche (D-G)

De l'extérieur, les vertébrés présentent une symétrie quasi parfaite, pourtant ce n'est pas le cas au niveau de l'organisation des organes internes. Par exemple, chez l'homme, le cœur est situé à gauche et le foie à droite. La mise en place de cette polarité D-G est déterminée très tôt au cours de l'embryogénèse avant même la mise en place des organes. La mise en place du nœud embryonnaire est déterminante pour cette polarité. Il est formé par l'invagination des cellules de l'épiderme qui vont constituer le mésoderme au-dessus de l'endoderme. Les trois feuillettes de l'embryon sont alors mis en place. Les cellules du mésoderme possèdent un cil motile en position distale à leur surface apicale qui pointe vers la partie postérieure de l'embryon. Ces cils battant de façon coordonnée de la droite vers la gauche conduisent à la formation d'un flux liquidien orienté vers la gauche. Ce mouvement permet la restriction asymétrique de l'expression du gène *Nodal* à la surface de l'embryon. Ce mécanisme est à l'origine d'une rupture de l'axe de symétrie de l'embryon caractérisant alors l'axe D-G (Gros, 2009; Hashimoto and Hamada, 2010). De nombreuses études définissent cette rupture de symétrie par l'apparition de l'expression asymétrique des gènes centraux de la voie de signalisation de la Polarité Cellulaire Planaire (PCP) à la surface apicale de ces cellules (Antic et al., 2010; Aw and Levin, 2009). En effet, l'expression

asymétrique des protéines de la voie de signalisation de la PCP guide la migration et le positionnement correct du cil au pôle postérieur à la surface apicale de la cellule (Antic et al., 2010). Ainsi, la mutation de gènes de la PCP conduit à une perturbation de la mise en place de l'axe D-G de l'embryon due à un mauvais positionnement du cil (Song et al., 2010). Cette perturbation peut aboutir à des pathologies telles que le *situs inversus* (1 cas sur 10000) où les organes sont inversés (Blum and Ott, 2018). Mais ce mécanisme est aussi indispensable à l'échelle de l'organe. En effet, bien que les mécanismes permettant la mise en place de la polarité D-G ne soient pas encore totalement élucidés au niveau des organes, une étude récente met en évidence que l'absence de battement des cils au niveau du nœud embryonnaire conduit à un défaut morphologique et de positionnement du cœur. Chez l'homme le cœur est situé à gauche et pointe vers la gauche. Cependant, dans certains cas, comme lors de la mutation du gène *Dnaic1* nécessaire à la motilité du cil, l'orientation et la morphologie du cœur sont perturbées (Francis et al., 2012).

C. La polarité Apico-Basale (A-B)

La polarité A-B permet de définir un pôle apical, en contact avec le milieu extracellulaire, opposé à un pôle basolatéral, éloigné du milieu extracellulaire. Les cellules intestinales sont d'excellents exemples pour visualiser cette asymétrie cellulaire. Ces cellules possèdent un pôle apical, en contact avec la lumière intestinale, formé de microvillosités essentielles à l'absorption des nutriments et d'un pôle basolatéral, dépourvu d'appendice, à l'opposé de la lumière intestinale et donc du milieu extracellulaire. Afin de maintenir cette asymétrie et une fonctionnalité du tissu, les cellules épithéliales possèdent des jonctions cellulaires qui sont des séparateurs physiques empêchant la diffusion de molécules du domaine apical vers le domaine basolatéral et *vice versa*. Cette cohésion tissulaire fait intervenir deux catégories de jonctions intercellulaires : les jonctions serrées (Tight junction (TJ) ou Zonula Occludens (ZO)) qui délimitent le domaine apical, et les jonctions adhérentes (Adherens Junction (AJ) ou Zonula Adherens (ZA)) situées sous les TJ, et qui définissent le début du domaine basolatéral (Shin et al., 2006; Wang and Margolis, 2007). Les TJ sont composées de trois familles de protéines transmembranaires qui forment des liaisons homophiliques entre elles : les occludines, les claudines et les JAM (Junctional Adhesion Molecules). Elles ont pour fonction principale de créer une barrière de perméabilité sélective pour conserver une différence de composition entre les domaines apical et basolatéral. Par le biais d'une interaction directe ou indirecte avec les protéines Zonula Occludens (ZO1 à 3), elles possèdent un lien avec le cytosquelette d'actine. Quant aux AJ, elles sont enrichies en cadhérines et nectines formant entre elles des liaisons homophiliques. Les caténines permettent de faire le

lien entre les microfilaments d'actine et les cadhérines alors que l'afadine (Actin Filament binding protein) permet la jonction entre les microfilaments d'actines et les nectines (Niessen, 2007). Le maintien de cette architecture est essentiel à la mise en place de la polarité A-B et au bon fonctionnement tissulaire.

La mise en place de cette polarité nécessite une distribution asymétrique de trois complexes protéiques spécifiques. Un complexe basolatéral, composé des protéines Scribble, Lgl (Lethal Giant Larvae) et Dlg (Discs Large) et deux complexes apicaux qui sont :

- Le complexe Crumbs : formé des protéines Crumbs, Pals1 (Protein Associated With Lin7 1 ou Stardust chez la drosophile), et Patj (Pals1-associated tight junction).
- Et le complexe Par : formé des protéines Par6, Par3 (ou Bazooka chez la drosophile) et aPKC (atypical Protein Kinase C).

Ces complexes de polarité, initialement découverts chez les invertébrés, sont conservés au cours de l'évolution et ont beaucoup été décrits chez les mammifères. Cependant, de nombreuses duplications et translocations de ces gènes au cours de l'évolution ont fait apparaître de nombreux homologues chez les mammifères conduisant souvent à une redondance de fonction, ce qui rend plus difficile l'étude de ces gènes chez les mammifères. C'est pour ces raisons que les invertébrés restent d'excellents modèles d'études pour la compréhension des mécanismes avant de pouvoir faire un parallèle chez les mammifères. J'ai donc choisi de vous décrire la découverte et la fonction de ces complexes de protéines spécifiques intervenant dans la mise en place de la polarité A-B chez les invertébrés puis chez les mammifères.

1. Le complexe Par

a. Découverte du complexe Par chez les invertébrés

C'est en 1988 que le Dr Kemphues découvrit les protéines du complexe Par (Partition déféctive) en analysant la première division asymétrique du *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Il identifia ainsi six protéines Par, indispensables à la mise en place de la polarité chez cet organisme. Par1 et 2 sont accumulées au pôle Postérieur du zygote alors que Par3 et 6 sont accumulées au pôle Antérieur et Par4 et 5 sont cytosoliques. Ces protéines sont mutuellement dépendantes, c'est-à-dire que l'absence de l'une affectera l'expression asymétrique des autres. Cette perturbation aura pour conséquence une perte de polarité et un défaut de développement chez cet organisme (Kemphues et al., 1988). Ce n'est que plus tard que le Dr Tabuse découvrit l'existence de PKC-3 (Protein Kinase C like 3), une protéine associée à la protéine Par3 lors de

la mise en place de la polarité chez le *C. elegans*. C'est alors que le complexe Par3/Par6/PKC-3 fut décrit comme étant au cœur du processus de la mise en place de la polarité de l'organisme (Tabuse et al., 1998).

b. Complexe Par chez les mammifères

Chez les mammifères le complexe Par, composé des protéines Par6, Par3 et aPKC, est un complexe protéique régulateur essentiel à l'établissement de la polarité cellulaire A-B.

- **Par6**

Chez les mammifères, il existe 4 isoformes de Par6 : Par6A, B, C et D qui possèdent des profils d'expression différents en fonction des tissus. Ces isoformes ont des fonctions similaires et sont composées de trois domaines protéiques conservés au cours de l'évolution : un domaine PB1 (Phox/Bem1), un domaine semi-CRIB (Cdc42/Rac Interaction Binding) et un domaine PDZ (Post synaptic density protein 95 (PSD95) – Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1) – Zonula occludens-1 (ZO-1)) (Assémat et al., 2008) (*figure 1*).

- **Par3**

Il existe deux isoformes de Par3 chez les mammifères : Par3A et Par3B. Chacune de ces isoformes est exprimée de façon préférentielle dans certains tissus. Par3A est l'isoforme la plus largement exprimée dans les tissus et par conséquent la plus étudiée. Les protéines Par3 sont stabilisées au niveau des TJ dans les cellules épithéliales de mammifère. Elles sont composées d'un domaine N-terminal CR1 (Complement Receptor 1), de trois domaines PDZ et d'un domaine CR3 (Complement Receptor 3) (Assémat et al., 2008). Par3 est recrutée et stabilisée aux jonctions intercellulaires apicales (TJ et AJ) grâce à son interaction directe avec les protéines JAM et nectines (Itoh et al., 2001a; Takekuni et al., 2003) (*figure 1*).

- **aPKC**

Chez les mammifères deux isoformes de la protéine aPKC existent : aPKC λ / ι et aPKC ζ . Ces protéines sont composées d'un domaine PB1, d'un domaine riche en zinc et d'un domaine kinase (Assémat et al., 2008). Ces protéines sont dotées d'une activité kinase, qui permet de réguler l'expression et la localisation des autres protéines du complexe Par par phosphorylation (*figure 1*).

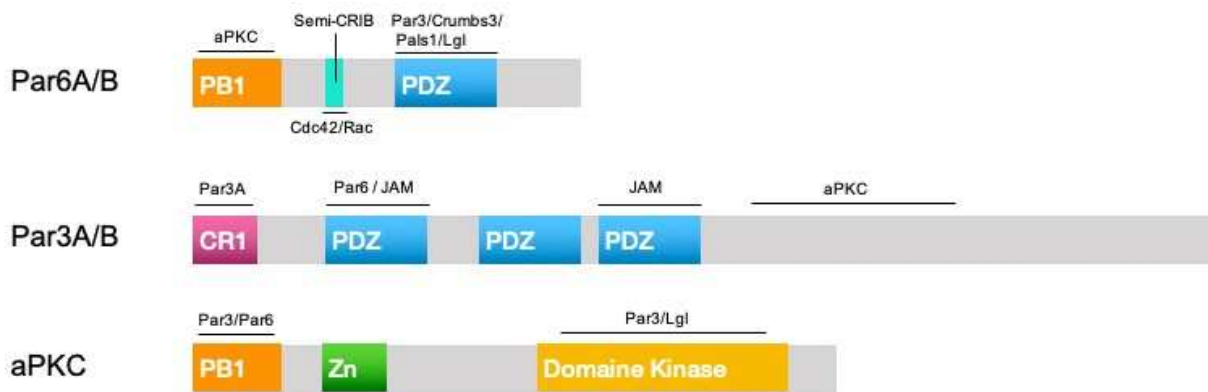


Figure 1 : Représentation schématique des protéines du complexe Par. La ligne noire au dessus des protéines indique les interactions protéiques réalisées par ces protéines. (adapté de (Assémat et al., 2008))

2. Le complexe Crumbs

a. Découverte du complexe Crumbs chez les invertébrés

En 1984, le Dr Jürgens découvre que la mutation du gène *Crumbs* conduit à la formation de trous à la surface de la cuticule de la drosophile (*Drosophila melanogaster* - épithélium de la larve de drosophile) (Jürgens et al., 1984). En fait, chez la drosophile la surexpression de la protéine Crumbs (codée par le gène du même nom) a pour conséquence une augmentation de la surface du domaine apical, alors qu'à l'inverse son absence conduit à la perte du domaine apical. Ces données démontrent bien toute l'importance de cette protéine dans la régulation de la mise en place de la polarité A-B. Quelques années après cette découverte, le Dr Tepass découvre que l'absence de la protéine Stardust, interagissant avec la protéine Crumbs, conduit elle aussi à la présence de trous dans la cuticule de la drosophile (Tepass and Knust, 1993). Puis en 1999, une nouvelle protéine s'ajoute à ce complexe, Dpatj, anciennement appelée Dlt (Discs lost) (Bhat et al., 1999). L'ensemble de ces protéines forment alors le complexe Crumbs/Stardust/Dpatj caractérisé comme un complexe protéique apical essentiel à l'identité du domaine apical, tout comme le complexe Par.

b. Complexe Crumbs chez les mammifères

- **Crumbs**

Il existe trois isoformes de la protéine Crumbs chez les mammifères, Crumbs 1, 2 et 3. Ces protéines transmembranaires sont exprimées à la surface apicale des cellules épithéliales. Les protéines Crumbs 1 et 2 possèdent un très grand domaine extracellulaire alors que ce domaine

est plus restreint chez la protéine Crumbs 3. Leurs différentes expressions tissulaires suggèrent une différence au niveau fonctionnel. En effet, Crumbs 1 est exprimée préférentiellement au niveau du cerveau et de la rétine, Crumbs 2 au niveau du cerveau, de la rétine et du rein, alors que Crumbs 3 est plus ubiquitaire et est exprimée dans les muscles et toutes les cellules épithéliales (Assémat et al., 2008). Contrairement à leur domaine extracellulaire, ces différentes isoformes ont un domaine intracellulaire conservé. En effet, elles possèdent toutes un domaine FERM (F pour 4.1 protein, E pour Ezrin, R pour Radixin et M pour Moesin) et un PDZ binding domain (PDZBD). L'isoforme 3 de Crumbs possède un domaine supplémentaire qui est un domaine Src Homology 3 (SH3), ce qui suggère que cette isoforme est impliquée dans des voies de signalisation différentes des deux autres isoformes. Effectivement, seule Crumbs 3 a été décrite comme étant indispensable pour la formation du cil primaire par exemple (*figure 2*) (Fan et al., 2004).

- **Pals1**

Pals1, homologue de Stardust chez la drosophile aussi appelé MPP5 (Membrane-associated Palmytoylated Protein 5), est une protéine d'échafaudage formée de deux domaines L27, d'un domaine PDZ, d'un domaine SH3 et d'un domaine GUK (Guanylate Kinase). Pals1 permet de faire le lien entre Patj et Crumbs. Pour cela, Pals1 peut lier à la fois Crumbs 3 par le biais de son domaine PDZ et Patj par ses domaines L27. L'absence de Pals1 a un impact direct sur l'expression de Patj sans perturber l'expression de Crumbs 3 (*figure 2*) (Roh et al., 2003) .

- **Patj**

Patj, homologue de Dpatj chez la drosophile, est une protéine d'échafaudage formée d'un domaine L27 et de 10 domaines PDZ. Elle est connue pour se lier directement aux TJ en interagissant avec ZO-3 et claudin1 (Roh et al., 2002a). De ce fait, la surexpression de cette protéine affecte la stabilité des TJ par modification d'expression des protéines qui composent ces jonctions. De plus, l'absence d'expression de Patj est en lien avec la perte d'expression de Pals1 et Crumbs 3 à la surface apicale des cellules. Ce qui suggère que Patj est une protéine qui fait le lien entre les protéines de jonction latérales et les protéines apicales (Michel et al., 2005; Roh et al., 2002b) (*figure 2*).

- **Mpdz/Mupp1**

Chez les mammifères, il existe une autre isoforme de Patj appelée Mpdz ou Mupp1 (Multiple PDZ domain protein). Cette protéine, très similaire à Patj, est composée d'un domaine L27 et de 13 domaines PDZ. Chez l'homme, l'absence de cette protéine conduit à des hydrocéphalies congénitales sévères souvent associées à d'autres phénotypes tels que la mauvaise orientation du tube digestif ou des pertes auditives (OMIM : 603785) (Shaheen et al., 2017). A ce jour, le mécanisme moléculaire en lien avec ces phénotypes est encore inconnu (*figure 2*).

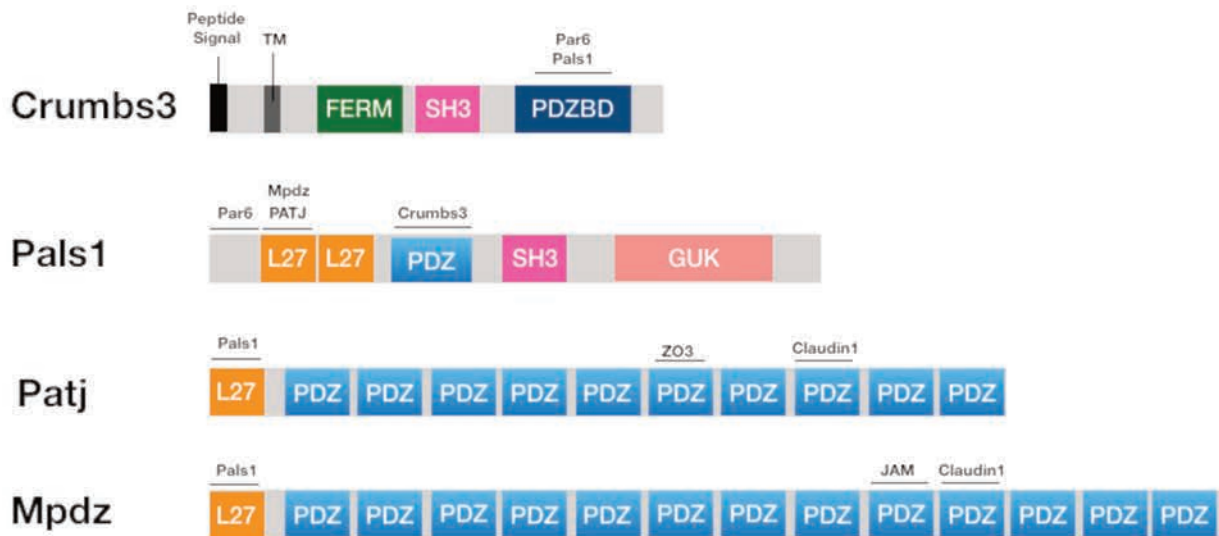


Figure 2 : Représentation schématique des protéines du complexe Crumbs. La ligne noire au dessus des protéines indique les interactions protéiques réalisées par ces protéines. (adapté de (Assémat et al., 2008))

3. Le complexe Scribble, Lgl, Dlg

a. Découverte chez les invertébrés

C'est en 2000 que le Dr Bilder découvre que la mutation d'un gène conduit à une désorganisation de l'épithélium chez la drosophile, mutation conduisant à une cuticule ondulée avec des cellules plus rondes et malformées. Ce gène sera alors appelé *Scribble* (*Scrib*) pour faire référence à ce phénotype (Bilder and Perrimon, 2000). Deux autres gènes sont identifiés plus tard en lien avec *Scrib* du fait de leur similarité de phénotype lors de leurs mutations chez la drosophile. Ces deux gènes codent pour les protéines Dlg et Lgl. Le complexe alors formé de Scrib, Dlg et Lgl sera décrit comme un complexe de polarité basolatérale permettant de restreindre l'étendue du domaine apical.

b. Complexe Scribble, Lgl, Dlg chez les mammifères

Le complexe protéique formé de Scribble, Lgl et Dlg est très conservé chez les mammifères. Ces protéines cytosoliques, accumulées au pôle basolatéral de la cellule, sont essentielles pour la maintenance et la délimitation du domaine apical et du domaine basolatéral, grâce à des mécanismes d'inhibition et d'exclusion.

4. Mécanismes moléculaires permettant la mise en place de la polarité A-B

La polarité apicale dépend d'une distribution asymétrique de complexes protéiques qui exercent un mécanisme d'inhibition et d'exclusion entre eux, dans le but de définir une identité différente entre les deux pôles. Toute perturbation de cette organisation bien particulière conduira à une perte d'identité de ces domaines. La mise en place de la polarité A-B a beaucoup été étudiée chez les invertébrés (drosophile et *C. elegans*). Cependant, de nombreuses études démontrent *in vitro* grâce à des cellules épithéliales humaines (cellules Madin-Darby-Canine-Kidney (MDCK)), que beaucoup de ces mécanismes ont été conservés chez les vertébrés. Dans ce système, la mise en place et le maintien d'une polarité A-B se font selon le schéma décrit ci-dessous (*figure 3*). (1) Initialement, Par6 forme un complexe avec aPKC grâce à une interaction entre leurs domaines PB1 (Suzuki et al., 2001; Yamanaka et al., 2001). Cette liaison de Par6 à aPKC conduit à une perte de l'activité kinase de aPKC (Hirano et al., 2005). En absence de phosphorylation, Lgl se lie à aPKC et forme le complexe Par6-aPKC-Lgl (Yamanaka et al., 2003). Par3 est stabilisée au niveau des TJ par le biais d'une interaction avec les protéines JAM (Itoh et al., 2001b). (2) Par6 liée à aPKC/Lgl va alors être recrutée au niveau de la membrane plasmique en se liant à Cdc42 (Cell Division Control 42) par l'intermédiaire de son domaine Semi-CRIB (Garrard et al., 2003; Hutterer et al., 2004). (3) Grâce à cette liaison, le complexe Par6-aPKC-Lgl est stabilisé à la membrane et permet l'activation de aPKC. Cette activation va conduire à la phosphorylation de Lgl qui va alors se dissocier du complexe Par6-aPKC et migrer vers le pôle basolatéral (Yamanaka et al., 2003). (4) En position basolatérale Lgl va se lier au complexe Dlg/Scrib déjà formé afin de définir l'identité du domaine basolatéral (Plant et al., 2003). (5) Le complexe Par6/aPKC va alors pouvoir se lier à Par3 au pôle apical de la cellule. Par6 va pouvoir se lier à Par3 grâce à leurs domaines PDZ (Lin et al., 2000). Par3, par le biais de son domaine C3 va alors se lier au domaine kinase de aPKC, et par conséquent rendre inactive la fonction kinase de aPKC (Nagai-Tamai et al., 2002). (6) Ce nouveau complexe Par6-aPKC-Par3 stabilisé à la membrane va alors permettre de participer à l'identité du pôle apical. (7) Quant au complexe Crumbs, on retrouve la protéine Crumbs enchâssée dans la membrane interagissant avec Patj ou Mpdz par le biais de Pals1

(Adachi et al., 2009; Makarova et al., 2003; Roh et al., 2002b). Ce complexe est d'autant plus stabilisé à la membrane au pôle apical de la cellule grâce à l'interaction de Patj (interaction avec ZO1 et Claudin1 - (Roh et al., 2002b)) et Mpdz (interaction avec les Claudin1 et les JAM - (Hamazaki et al., 2002)) avec les protéines des TJ et AJ. (8) Enfin, les complexes Crumbs et Par sont liés entre eux par une interaction entre Par6 et Pals1 (*figure 3*) (Wang et al., 2004).

Ensemble, les complexes Par et Crumbs sont stabilisés et définissent l'identité du domaine apical, alors qu'à l'inverse le complexe Scrib/Dlg/Lgl définit le domaine basolatéral (Assémat et al., 2008; Macara, 2004; Margolis and Borg, 2005; Wen and Zhang, 2018). Le maintien et la restriction de ces domaines est possible grâce à un mécanisme d'inhibition mutuel entre les complexes apicaux et le complexe basolatéral (Wen and Zhang, 2018). Ce phénomène est facilement observable chez la drosophile où on observe que la mutation de *Crumbs* conduit à une perte d'identité du domaine apical et une extension du domaine basolatéral sur toute la hauteur de la cellule. A l'inverse une mutation de *Lgl* conduit à une perte d'identité du domaine basolatéral et une extension du domaine apical et la formation des TJ à la base de la cellule (Kaplan et al., 2009).

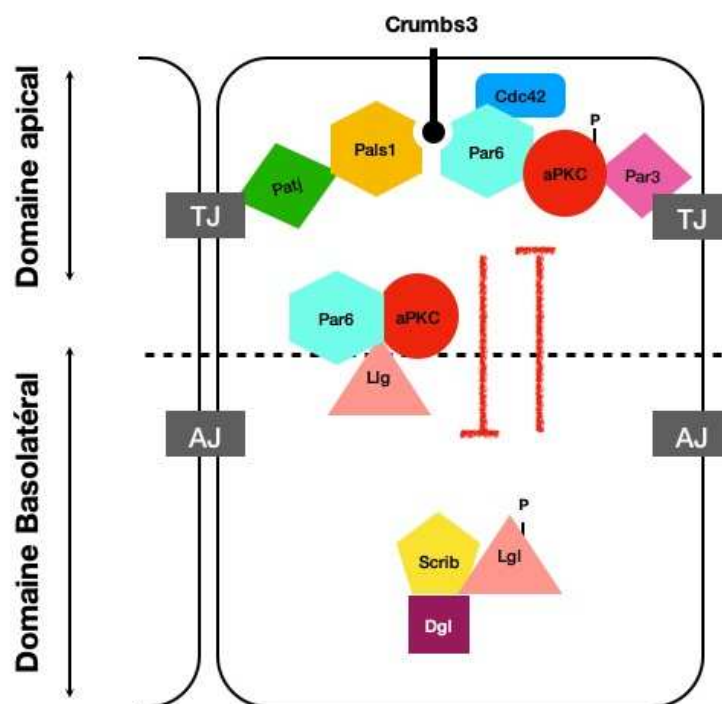


Figure 3 : Représentation schématique des mécanismes moléculaires permettant la mise en place de la polarité Apico-Basale. Flèche rouge : mécanisme d'inhibition ; P : phosphorylation ; AJ : jonction adhérente ; TJ : jonction serrée. (adapté de (Margolis and Borg, 2005)

D. Polarité Cellulaire Planaire centrale (PCP) ou polarité dans le plan (core PCP)

1. Définitions

Outre la polarité A-B, certaines cellules épithéliales développent aussi une autre polarité appelée Polarité Cellulaire Planaire (PCP). La PCP est définie comme une polarité/orientation coordonnée des cellules épithéliales ou de structures dans le plan de l'épithélium. Initialement étudiée chez les invertébrés et plus particulièrement chez la drosophile, la PCP est souvent illustrée par l'orientation coordonnée distale des poils situés sur son aile, par la rotation des ommatidies (groupe de photorécepteurs), ou encore par l'orientation ordonnée des soies mécanosensorielles situées sur son abdomen, son thorax et ses pattes (Strutt and Strutt, 2009; Vinson and Adler, 1987). Chez les vertébrés, cette polarité se manifeste par exemple par l'orientation uniforme et directionnelle de structures externes, tel que l'alignement des écailles des poissons, des plumes des oiseaux ou des poils couvrant la peau. Dans les épithéliums, le mécanisme conduisant à cette polarité fait intervenir une voie de signalisation contrôlée par les six « gènes centraux » de la PCP (core PCP genes), conduisant à une régulation du cytosquelette d'actine et de tubuline. Ces gènes codent pour des protéines exprimées de façon asymétrique à la surface apicale et dans le plan des cellules épithéliales. Les interactions de ces protéines et les complexes qu'elles forment sont essentiels pour la détermination de la localisation planaire de l'appendice à la surface de la cellule.

2. La PCP chez les invertébrés

C'est en 1940 que le Dr Wigglesworth décrivit pour la première fois la notion de PCP. Il découvrit que les soies de la punaise *Rhodius* s'alignaient parfaitement le long de l'axe antéro-postérieur (Wigglesworth, 1940). Puis, en 1966, ce concept fut repris par le Dr Lawrence qui observa une organisation uniforme des poils à la surface du "milkweed bug" similaire à celle de la punaise *Rhodius* (Lawrence, 1966). Dans les années qui ont suivi, la drosophile fut l'un des modèles d'étude majeur pour la compréhension des mécanismes de la PCP. Chez cette espèce, la définition initiale de la PCP fait référence à une orientation spécifique et coordonnée de structures perpendiculaires à l'axe de l'épithélium. Cette organisation est particulièrement visible au niveau de l'orientation des poils à la surface de l'aile de drosophile. En effet, toutes les cellules épithéliales de l'aile de drosophile sont identiques, de forme hexagonale, et possèdent à leur surface apicale une extension cytoplasmique, similaire à un poil, appelé trichome (*figure 4A*). L'ensemble de ces trichomes, composés d'actine et de tubuline, sont orientés de façon uniforme au pôle distal de la cellule et pointent vers la partie distale de l'aile (Eaton, 1997a; Strutt, 2001).

Cette organisation très particulière est possible grâce au remodelage du cytosquelette d'actine et de tubuline en position distale de la cellule à partir duquel le trichome se développe (*figure 4B*). Ce mécanisme fait intervenir la voie de signalisation des protéines centrales de la PCP exprimées de façon asymétrique à la surface apicale des cellules afin de déterminer où le trichome sera positionné (*figure 4C*).

a. Protéines centrales de la PCP chez les invertébrés

La voie de signalisation de la PCP est conservée au cours de l'évolution et est contrôlée par six gènes centraux (« core PCP gene »). Cette voie de signalisation est composée de trois protéines transmembranaires : Van Gogh/Strabismus (Vang/Stbm), Frizzled (Fz), et Starry Night/Flamingo (Fmi), et de trois protéines cytosoliques : Prickle (Pk), Diego (Dgo) et Dishevelled (Dvl/Dsh) (Chae et al., 1999; Feiguin et al., 2001; Klingensmith et al., 1994; Strutt, 2001; Taylor et al., 1998; Tree et al., 2002; Usui et al., 1999; Vinson and Adler, 1987; Wolff and Rubin, 1998) (*figure 4C*). La découverte de ces gènes a été possible grâce à l'analyse de mutants spontanés chez la drosophile. L'ensemble de ces mutants ont pour caractéristique commune une désorganisation de l'orientation des trichomes à la surface de l'aile (*figure 4D*). Chaque équipe de recherche ayant mis en évidence l'importance de ces gènes leur ont donné des noms évoquant cette désorganisation. Ainsi, le nom du gène *Dishevelled* se traduit par "ébouriffé" et celui de *frizzled* par "frisé". Mais c'est aussi le cas pour le gène *Van Gogh*, car certains scientifiques ont vu le coup de pinceau de Vincent Van Gogh dans l'organisation en tourbillon des trichomes ou encore le gène *Flamingo/Starry Night* pour le nom d'une toile de Vincent Van Gogh.

- **Starry Night/Flamingo (Fmi)**

Le gène *Fmi* code pour un récepteur à sept domaines transmembranaires composé d'une partie C-terminale extracellulaire très longue et d'une partie N-terminale intracellulaire plus restreinte. Le domaine extracellulaire comporte neuf domaines de liaisons aux cadhérines, deux motifs de liaisons aux Laminines G, trois domaines riches en cystéines et quatre motifs de types EGF. Contrairement aux récepteurs classiques de la superfamille des cadhérines, *Fmi* est classée parmi les récepteurs non classiques de cette famille car elle ne comporte pas de domaines pouvant lier les protéines caténines en intracellulaire (Chae et al., 1999; Usui et al., 1999).

- **Frizzled (Fz)**

Le gène Fz code pour un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G, avec une partie N-terminale extracellulaire riche en cystéine (CRD) ayant une forte affinité pour les ligands Wnt ou les inhibiteurs sFRP (Secreted Frizzled Related Protein) et une partie C-terminale intracellulaire qui a la capacité de recruter Dsh en se liant à son domaine PDZ (Corda and Sala, 2017; Kilander et al., 2014; Strutt, 2001; Vinson and Adler, 1987).

- **Strabismus/Van Gogh (Stbm/Vang)**

Le gène Stbm code pour une protéine à quatre domaines transmembranaires avec une partie C- et N-terminale intracellulaires. La partie C-terminale possède des PDZBD permettant de nombreuses interactions protéines-protéines (Kibar et al., 2001; Taylor et al., 2018; Wolff and Rubin, 1998).

- **Prickle (Pk)**

Le gène Pk code pour une protéine cytosolique composée de trois domaines LIM (Lim1-1, Isl-1, Mec-3), un domaine CR (cysteine Rich) et un domaine PET (Prickle, Espinas, Testin). Ces domaines confèrent à Pk un rôle de protéine échafaudage en lui permettant de se lier au cytosquelette d'actine (Tree et al., 2002).

- **Dishevelled (Dvl/Dsh)**

Le gène Dsh code pour une protéine cytosolique composée de trois domaines comprenant un PDZ, un domaine DEP (Dishevelled EGL10 Plechstrin) et un domaine DIX (Dishevelled Axin) (Klingensmith et al., 1994).

- **Diego (Dgo)**

Le gène Dgo code pour une protéine cytosolique composée de quatre domaines ANK (Ankyrin repeat domain) (Feiguin et al., 2001; Maung and Jenny, 2011).

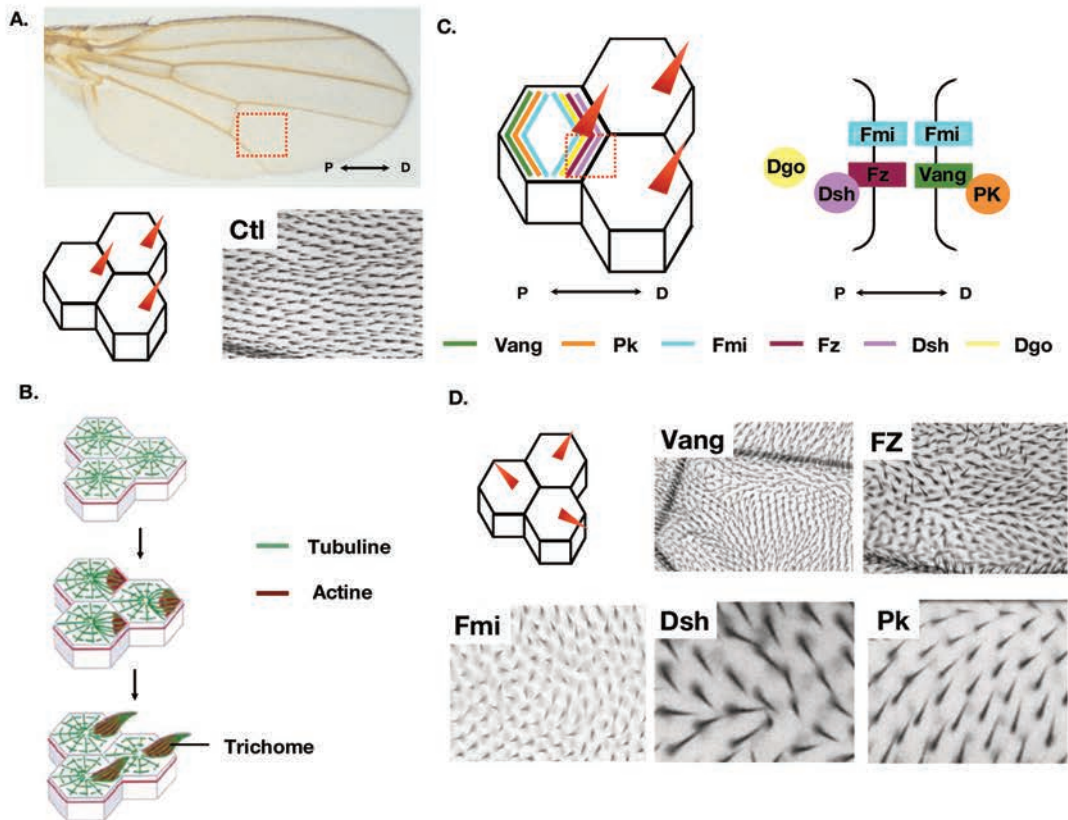


Figure 4 : La Polarité Cellulaire Planaire (PCP) chez la drosophile. (A) Sur l'image de l'aile de drosophile on peut observer une orientation coordonnée des trichomes en position distale (encadré rouge agrandi en dessous de l'image). En dessous de cette image d'aile de drosophile est schématisée des cellules hexagonales de l'aile avec le trichome (rouge) en position distale à la surface apicale ; (B) La concentration d'éléments du cytosquelette en position distale de la cellule va conduire à la formation et au positionnement correct du trichome ; (C) Distribution asymétrique des protéines de la voie centrale de la PCP à la surface apicale d'une cellule d'aile de drosophile. L'encadré rouge correspond à la représentation schématique de la distribution de ces protéines au niveau des jonctions intercellulaires ; (D) Images mettant en évidence la perturbation de l'orientation des trichomes à la surface de l'aide de drosophile lors d'une mutation d'un des gènes centraux de la PCP. P : Proximal, D : Distal, Ctl : contrôle ; Vang : Van Gogh, Fz : Frizzled, Fmi : Flamingo ; Dsh : Dishevelled, Pk : Prickle, Dgo : Diego. (adapté de : (Chae et al., 1999; Eaton, 1997b; Krasnow and Adler, 1994; Strutt, 2001; Wang et al., 2006; Wong, 1993))

b. Distribution asymétrique des protéines centrales de la PCP

Les protéines de la voie de la PCP sont exprimées de façon asymétrique à la surface apicale des cellules. Cette asymétrie permet d'établir un sens à la cellule en lui conférant un pôle distal et un pôle proximal. L'interaction de ces protéines entre elles permet de maintenir et de stabiliser cette distribution asymétrique au niveau des jonctions intercellulaires (figure 5). Initialement les protéines centrales de la PCP sont réparties au niveau cytosolique. Progressivement, Fmi va venir s'ancrer à la membrane et former des liaisons homophiliques intercellulaires, puis recruter Vang

en partie proximale et Fz en partie distale des cellules. Vang et Fz vont former des liaisons hétérophiliques intercellulaires et se stabiliser à la membrane plasmique. Fz peut alors recruter Dsh (Wong et al., 2003) alors que Vang va se lier à Pk (Bastock et al., 2003). Fmi a une distribution planaire, mais est la seule qui soit à la fois au pôle distal et proximal de la cellule. Fmi participe donc à deux complexes membranaires opposés, qui vont alors exercer une boucle de rétrocontrôle permettant de maintenir cette asymétrie. Pour cela, Pk peut bloquer l'association de Fz avec Dsh en intracellulaire (Tree et al., 2002), alors que Dgo peut se lier au complexe Vang/Pk et inhiber l'activité de Pk sur le complexe Fz/Dsh en intracellulaire (Jenny et al., 2005). Ce mécanisme permet de déterminer des domaines cellulaires mutuellement exclusifs afin de maintenir une asymétrie des protéines centrales de la PCP (*figure 5*) (Singh and Mlodzik, 2012; Zallen, 2007).

Ces protéines sont interdépendantes, cela signifie que la perturbation de l'une va engendrer une perturbation de la localisation des autres et que ceci sera visible par un phénotype PCP. Si nous prenons l'exemple de l'aile de drosophile, ce phénotype est caractérisé par une mauvaise localisation du poil à la surface apicale de la cellule (souvent en position centrale et non distale) ainsi qu'une orientation plus ou moins aléatoire de ces poils au sein du tissu. Cette interdépendance a été par exemple décrite pour la mutation du gène *Fz* qui engendre un phénotype PCP corrélé à une perturbation de la localisation de Vang, et *vice versa* (Adler and Lee, 2001; Taylor et al., 1998).

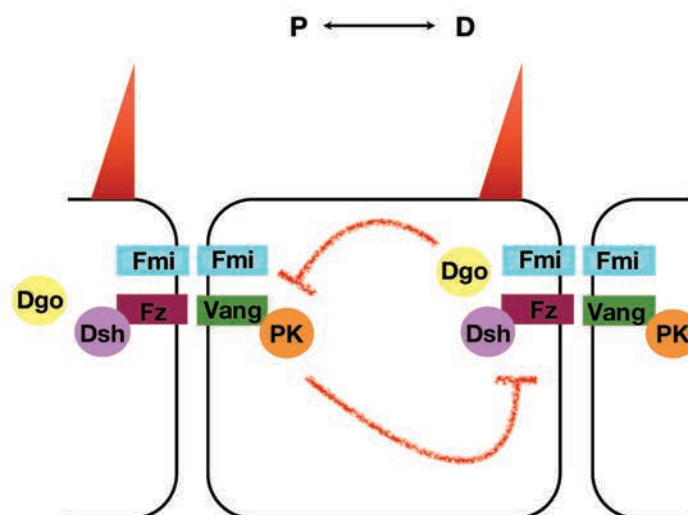


Figure 5 : Représentation schématique de la boucle de rétrocontrôle entre les protéines centrales de la PCP au sein d'une cellule d'aile de drosophile. D : Distal, Dgo : Diego, Dsh : Dishevelled, Fmi : Flamingo, Fz : Frizzled, Pk : Prickle, Vang : Van Gogh, Flèche rouge : Boucle de rétrocontrôle, P : Proximal, Triangle rouge : Trichome.

c. Régulation du cytosquelette par les protéines centrales de la PCP

La mutation des gènes centraux de la PCP engendre une mauvaise localisation du trichome (position centrale et non distale) et une mauvaise orientation de celui-ci. Cependant, cette voie de signalisation ne perturbe pas sa formation. Sachant que la position du trichome se développe dans une région riche en actine filamenteuse (actine-F), une des hypothèses émises est que les protéines centrales de la PCP recrutent des facteurs modulateurs de l'actine. Ainsi, il a été démontré que Vang recrute des facteurs régulant négativement la formation du trichome d'actine au pôle proximal de la cellule, tels que Inturned, Fuzzy et Fritz. Ces facteurs vont recruter à leur tour un répresseur de la polymérisation d'actine, appelé Multiple Wing Hair (Mwh). L'absence d'expression de Mwh engendre le développement ectopique du trichome au sein de la cellule par perte du point précis de genèse du trichome (Adler et al., 2004; Strutt and Warrington, 2008; Wong, 1993). DRok (Drosophila Rho associated Kinase) et RhoA ont aussi été décrites comme étant impliquées dans la formation du trichome en tant qu'effecteurs de la PCP. L'absence de ces protéines est connue pour affecter le nombre de trichomes formés dans l'aile de drosophile (Winter et al., 2001; Yan et al., 2009). Les Formins, connues pour leurs fonctions sur la nucléation et l'élongation de l'actine, sont aussi des effecteurs de la PCP. En effet, il a été montré que la perte de fonction ou l'expression constitutive de Diaphanous, une protéine de la famille des Formins activée par Rho, induit une malformation, un nombre anormal et une mauvaise orientation des trichomes à la surface apicale des cellules de l'aile de la drosophile (Lu and Adler, 2015).

d. PCP autonome et non autonome

L'avantage de l'aile de drosophile comme modèle d'étude est qu'il est possible de muter spécifiquement certaines cellules pour un gène (clones) pour former un animal "mosaïque". Grâce à ce système il a été découvert que les gènes centraux de la PCP ont une dualité de fonctions et agissent à deux niveaux (*figure 6*) :

- (1) Au niveau tissulaire : cette fonction non autonome nécessite une communication intercellulaire possible grâce aux protéines centrales de la PCP transmembranaires. Ce processus permet l'établissement d'un axe dans le tissu et la coordination de toutes les cellules entre elles pour un positionnement des structures apicales. Seules les protéines transmembranaires de la PCP (Fz, Vang, Fmi) participent à cette fonction. D'un point de vue temporel, la fonction non autonome se met en place en amont de la fonction autonome.

- (2) Au niveau cellulaire : cette fonction autonome intervient dans le positionnement correct de la structure apicale au sein de la cellule. Ce processus nécessite à la fois les protéines cytosoliques et transmembranaires de la PCP.

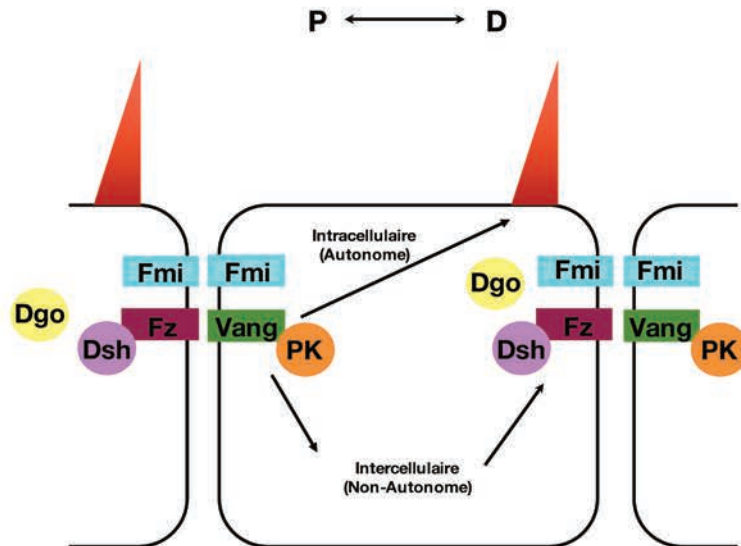


Figure 6 : Fonction autonome et non autonome des protéines de la voie centrale de la PCP. La fonction non autonome (intercellulaire) est mise en place avant la fonction autonome (intracellulaire). Initialement, les protéines transmembranaires Vang (proximal) et Fz (distal) participent ensemble à la voie de signalisation non autonome de la PCP afin de propager cette information à travers le tissu. Puis, les protéines cytoplasmiques Dgo, Dsh et Pk distribuées asymétriquement, participent à la voie autonome de la PCP et à la mise en place du trichome en position distale à la surface apicale de la cellule d'aile de drosophile. La protéine Fmi, exprimée à la fois au niveau proximal et distal, est nécessaire pour les fonctions autonome et non autonome. Dgo : Diego, Dsh : Dishevelled, Fmi : Flamingo, Fz : Frizzled, Pk : Prickle, Vang : Van Gogh. Triangle rouge : Trichome P : Proximal, D : Distal.

Dsh, *Pk* et *Dgo* n'exercent donc qu'une fonction autonome, puisque la mutation de l'un de ces gènes perturbe uniquement l'orientation du trichome au sein de la cellule mutée sans perturber l'orientation des trichomes des cellules aux alentours (Strutt and Strutt, 2007). Fmi est nécessaire aux 2 fonctions, autonome et non autonome, car elle est essentielle au recrutement de Fz et de Vang (Chae et al., 1999). Enfin, *Fz* et *vang* ont également une double fonction et la mutation de chacun de ces gènes conduit à une modification de la PCP au sein de la cellule, avec une mauvaise orientation du trichome, mais aussi une perturbation de l'orientation des trichomes au sein des cellules non mutées avoisinantes (Taylor et al., 1998; Vinson and Adler, 1987). De plus, il semblerait que ces deux protéines aient des fonctions antagonistes l'une de l'autre sur la régulation de la voie de signalisation de la PCP. En effet, les trichomes des cellules sauvages entourant un clone muté pour *Fz* pointent vers ce clone, alors qu'à l'inverse ils pointent à l'opposé

des clones mutés pour *vang* (Taylor et al., 1998; Wu and Mlodzik, 2008). Il y a donc une communication intra- et intercellulaire qui permet une coordination de la position du trichome au sein de la cellule et du tissu. En 2008, les Dr Wu et Mlodzik suggèrent que le domaine extracellulaire de Fz peut interagir avec Vang permettant une communication intercellulaire tout en participant à l'expression asymétrique au sein des cellules (*figure 6*).

3. PCP chez les vertébrés et les mammifères

Chez les mammifères, la voie de signalisation de la PCP entre en jeu dans des mécanismes bien définis au cours du développement et toute perturbation de cette voie conduira à des anomalies développementales. Chez les mammifères, y compris l'homme, la conséquence structurelle majeure et commune de la mutation des gènes centraux orthologues de ceux de la drosophile, est un défaut de fermeture du tube neural (Cai and Shi, 2014; De Marco et al., 2014; Ueno and Greene, 2003). Mais de nombreux tissus sont impactés par des mutations dans les gènes de la PCP, car les protéines pour lesquelles ils codent participent à de nombreux mécanismes. Ainsi, les tissus comme le cœur, les reins, les poumons ne se développent pas normalement (Henderson et al., 2018). Ces perturbations du développement de ces tissus sont dues à l'implication des protéines de la PCP dans des mécanismes aussi divers que la migration neuronale (Qu et al., 2010; Vivancos et al., 2009), et plus généralement le mouvement dirigé des cellules (mécanisme d'extension/onvergente), le guidage axonal (Ghimire et al., 2018; Rachel et al., 2000), la division asymétrique (Gomes et al., 2009), la mise en place du cil primaire des cellules, l'organisation du battement directionnel des cellules ciliées (voir polarité D-G) ou encore la mise en place des stéréocils au sein des cellules auditives et l'orientation des poils en général (Devenport and Fuchs, 2008).

a. PCP et Extension/Convergente (EC)

Des études de perte de fonction et gain de fonction des gènes de la PCP et de leurs isoformes chez le xénope et le poisson zèbre (zebrafish) ont permis de mettre en évidence l'implication des gènes centraux de la PCP lors de la gastrulation et de la fermeture du tube neural, et en particulier dans le mécanisme dit d'Extension/Convergente (EC) (*figure 7*). C'est en 1943 que ce mécanisme a été décrit pour la première fois comme un mécanisme indispensable au développement et à la morphogenèse de tout organisme (Holtfreter, 1943). L'EC fait référence à un réarrangement cellulaire par intercalation en absence de prolifération. Ce mécanisme embryonnaire permet de passer d'un épithélium pseudo-stratifié à un épithélium aminci et allongé par réorganisation dirigée

du même nombre de cellules. Mécanistiquement les cellules épithéliales émettent des prolongements cytoplasmiques riches en actine (lamellipodes) pour contacter et toucher les cellules voisines selon l'axe proximo-distal uniquement (et non pas antéro-postérieur) au cours de la gastrulation. Ces lamellipodes alors stabilisés vont progressivement se rétracter créant un mouvement cellulaire et une intercalation des cellules entre elles selon l'axe antéro-postérieur mais aussi proximo-distal (Wallingford, 2012) (*figure 7*). C'est dans les années 90 qu'il est montré pour la première fois chez le xénope que ce processus faisait intervenir une modulation du cytosquelette d'actine et de tubuline par les gènes centraux de la PCP. En effet, il a été décrit que la mutation de *Dsh* et *Fz8* impactait la stabilité des filopodes et en conséquence affectait l'intercalation cellulaire (Deardorff et al., 1998; Sokol, 1996). Une certaine conservation des mécanismes moléculaires d'asymétrie des protéines de la PCP a été mise en évidence par analyse de la surexpression de *Dsh* et *Pk* lors de l'imagerie de cellules vivantes en mouvement. Cette analyse a en effet démontré que *Pk* était accumulée au pôle antérieur des cellules et *Dsh* au pôle postérieur, dans des régions opposées de la cellule tout comme dans les cellules épithéliales de l'aile de drosophile (Yin et al., 2008). Cette répartition asymétrique est donc indispensable au mécanisme d'EC. Depuis, de nombreuses études ont démontrés l'implication d'autres gènes centraux de la PCP dans ce processus, en particulier *Vangl2* (Wallingford, 2012).

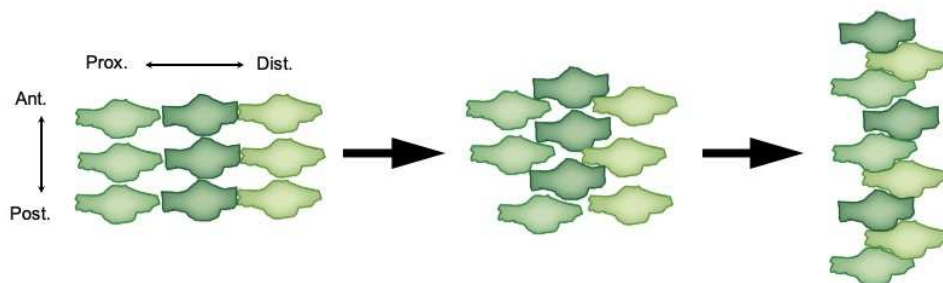


Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme d'Extension/Convergente (EC). Les cellules vont dans un premier temps migrer et s'intercaler selon l'axe proximo-distal, puis selon l'axe antéro-postérieur afin d'aboutir à un allongement de l'épithélium sans prolifération cellulaire. Prox : Proximal, Dist : Distal, Ant : Antérieur, Post : Postérieur. (adapté de (Wallingford, 2012))

b. Gènes et protéines centrales de la PCP chez les mammifères : l'oreille interne

L'apparition d'un grand nombre d'isoformes des protéines de la PCP rend l'étude de leurs mutations chez les mammifères plus complexe. Ces isoformes, aux fonctions souvent redondantes, semblent également participer à de nouveaux complexes protéiques et de nouveaux mécanismes cellulaires.

Comme mentionné précédemment, une mutation simple ou multiple des différents isoformes des gènes centraux de la PCP conduit à des défauts de fermeture du tube neural. Chez l'homme, cette anomalie est appelée *Spina bifida* lorsque la partie caudale seulement du tube neural n'est pas refermée alors que dans les cas les plus sévères on appelle cela une craniorachischisis (totalité du tube neural ouvert) (Ueno et al., 2003).

Le génome des mammifères n'est donc pas composé de seulement six gènes centraux, mais d'un nombre variable en fonction des familles codant pour de multiples isoformes :

- Van Gogh like 1 et 2 (Vangl 1 et 2) correspondant à Vang ;
- Frizzled 1 à 10 (Fz 1-10) correspondant à Frizzled ;
- Flamingo possède trois isoformes appelées Celsr1 à 3 (Cadherin EGF LAG Seven-Pass G-Type Receptor 1 à 3) ;
- Dishevelled possède trois isoformes du même nom (Dvl 1, 2 et 3) ;
- Prickle possède quatre isoformes du même nom Prickle 1 à 4 (Pk 1, 2, 3 et 4) ;
- Diego possède un seul isoforme appelé Ankrd6 (Ankyrin repeat domain containing protein 6), Diversin ou Inversin.

Une compensation fonctionnelle entre les membres d'une même famille a été démontrée. Il est donc commun de devoir muter plusieurs isoformes afin d'avoir un phénotype sévère. Chez les mammifères l'étude de la fonction et la découverte des gènes centraux de la PCP a particulièrement été possible grâce à l'utilisation de l'oreille interne comme modèle d'étude (voir chapitre II : Le système auditif et *annexe tableau 4*).

Van Gogh like 2 (*vangl2* homologue de *Van Gogh* chez les invertébrés) et *Celsr1* furent les deux premiers gènes centraux de la PCP identifiés chez les mammifères grâce à l'utilisation de l'oreille interne comme modèle d'étude (Curtin et al., 2003; Montcouquiol et al., 2003). Ainsi, en 2003 en utilisant une souris portant une mutation spontanée sur *vangl2* (souris *Looptail* (*Lp*)) et deux souris portant des mutations induites par traitement ENU (N-Ethyl-N-Nitroso-Urea) (souris *spin cycle* (*Scy*) et *crash* (*Crsh*)), deux équipes ont démontré la conservation de la fonction des gènes PCP dans un épithélium de mammifère. Ces deux études pionnières ont ouvert la voie à une étude plus systématique des multiples rôles (conservés ou non) des gènes de la PCP chez les mammifères.

L'épithélium auditif est composé d'un ensemble de cellules auditives, aussi appelées cellules ciliées (CC), composées d'un cil primaire de tubuline et d'un ensemble de stéréocils d'actine (touffe ciliaire) en position distale à la surface apicale de ces cellules (*figure 8A*). Le

positionnement de ce cil, nommé kinocil, définit précocement l'axe de la PCP dans cet organe, avant même la mise en place des stéréocils. La mutation des gènes de la PCP conduit à un phénotype PCP avec une perturbation du positionnement du kinocil et à une mauvaise orientation de la touffe ciliaire (*figure 8B*). Il est donc facile en faisant des marquages du kinocil et/ou de la touffe ciliaire, ou à partir d'images obtenues en microscopie électronique à balayage, d'identifier, et même de quantifier, des déficits de polarité dans le plan.

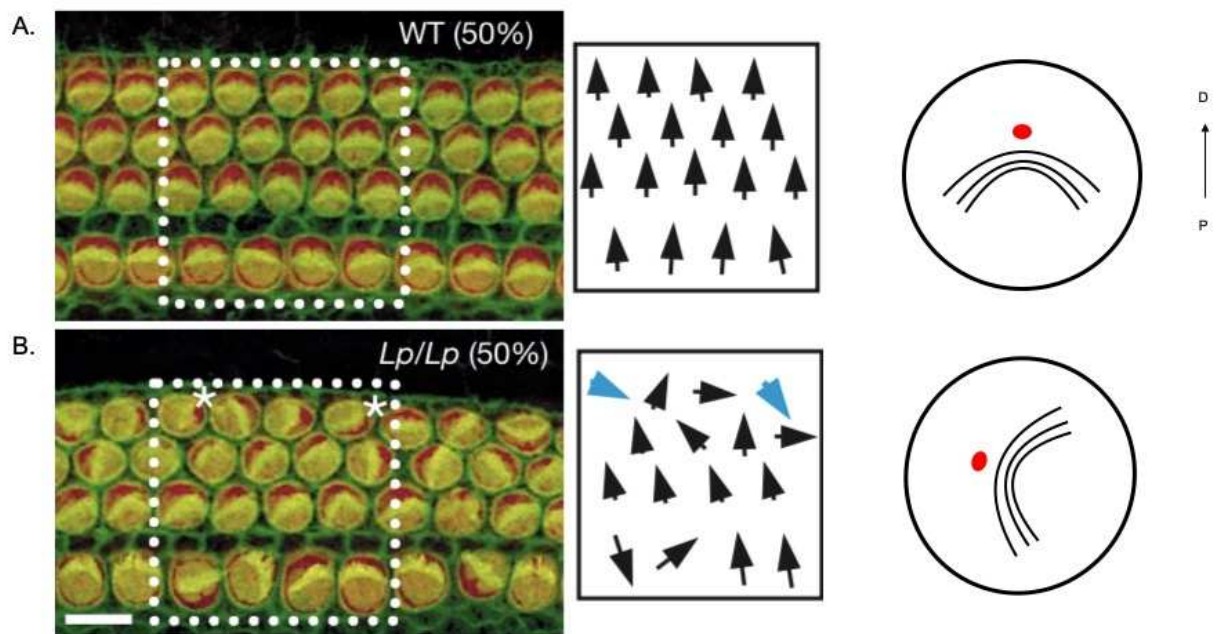


Figure 8 : Les protéines centrales de la PCP sont nécessaires à la mise en place de l'axe de la PCP dans l'épithélium auditif. (A) Vue de surface de l'épithélium auditif chez une souris contrôlée (WT). La touffe ciliaire (marquée par de la phalloïdine en vert) est arrangée sous forme d'un « V » à la surface apicale (immunomarkée par un anti-MyoVI en rouge) avec une coordination de l'orientation de des touffes ciliaires selon l'axe de la PCP. L'orientation des touffes ciliaires dans la région encadrée en blanc a été schématisée à l'aide de flèches. Une vue de surface d'une cellule ciliée (CC) dans une condition contrôlée a été schématisée (partie droite de la figure) ; **(B)** Vue de surface de l'épithélium auditif chez une souris mutée pour *vangl2* (*Lp/Lp*). La touffe ciliaire (marquée par de la phalloïdine en vert) est arrangée sous forme d'un « V » à la surface apicale (immunomarkée par un anti-MyoVI en rouge) avec une perturbation de l'orientation de ces touffes ciliaires. La perturbation des touffes ciliaires dans la région encadrée en blanc a été schématisée à l'aide de flèches. Une vue de surface d'une CC lors de la mutation du gène *vangl2* (*Lp/Lp*) a été schématisée (partie droite de la figure). P : proximal, D : distal (adapté de (Montcouquiol et al., 2003))

Grâce à la genèse et l'étude de nombreux mutants (spontanés, induits, conditionnels et totaux), il a ainsi été démontré que des phénotypes PCP dans l'épithélium auditif étaient liés à la mutation de chacun des homologues des six gènes centraux originaux (annexe - *tableau 4*). Comme indiqué précédemment, les mutants ENU sur *Celsr1* (*Scy* et *Crsh*) et *vangl2* (souris

Looptail (*Lp*) ont permis de mettre en évidence un phénotype PCP au sein des CC (Curtin et al., 2003; Montcouquiol et al., 2003) (*figure 8A-B*). Une perturbation de l'orientation des stéréocils au sein de la CC est observée en l'absence des protéines Fz3/6 (Wang et al., 2006), alors qu'il faut une mutation combinée des allèles *Dvl* (*Dvl2^{+/-} / Dvl3^{+/-}* ; *Dvl1^{+/-} / Dvl3^{-/-}* ; *Dvl1^{+/-} / Dvl2^{+/-}*) pour conduire à un phénotype de PCP (Etheridge et al., 2008; Wang et al., 2005). En revanche, la mutation d'*Ankrd6* ne conduit pas à un phénotype PCP, bien que la mutation homozygote de ce dernier gène avec une mutation hétérozygote de *vangl2* conduise à un faible phénotype PCP (*Ankrd6^{-/-} ; vangl2^{+/lp}*) (Jones et al., 2014). Enfin, la mutation de *Pk2* n'a pas d'effet puisque cette protéine n'est pas exprimée dans l'épithélium cochléaire. Seule sa localisation asymétrique à la surface apicale des CC vestibulaires (système de l'équilibre) a été rapportée (annexe - *tableau 4*) (Deans et al., 2007).

Il est à noter que les mutants spontanés tels que *Looptail* (*Lp/Lp*) mutant spontané *vang* : *vang^{Lp/p}* *Spin cerclé* (*Scy* – mutant spontané *Celsr1*) and *Crash* (*Crsh* - mutant spontané *Celsr1*) ont des phénotypes plus sévères que les knock-out (KO) générés par la suite (Copley et al., 2013; Curtin et al., 2003; Duncan et al., 2017; Montcouquiol et al., 2003; Yin et al., 2012). En effet, le Dr Duncan constate un phénotype PCP plus sévère lors de la mutation faux sens de *Celsr1* présente chez les mutants *Scy* et *Crsh* comparé à un mutant KO total pour ce gène (*Celsr1 KO*) (Curtin et al., 2003; Duncan et al., 2017). Cet effet dominant négatif est aussi observé lors de la mutation de *vangl2*. En effet, le Dr Yin en 2012, démontre que le mutant *vangl2^{ΔTMs/LP}* qui présente un allèle avec une mutation faux sens sur le gène *vangl2* (substitution d'une sérine en asparagine en position 464) et un allèle n'exprimant pas le gène *vangl2* conduit à un phénotype PCP plus sévère que l'absence du gène *vangl2* sur les deux allèles chez le mutant *vangl2 KO* (*Vangl2^{ΔTMs/ΔTMs}*). Au niveau protéique, il démontre une perturbation du trafic des protéines Vangl2 et Vangl1 à la membrane apicale chez le mutant *Lp*. A l'inverse, Vangl1 est normalement exprimée à la membrane apicale en absence de l'expression de Vangl2 chez le mutant *vangl2 KO*. Cette différence serait à l'origine du niveau de sévérité entre ces deux mutants et s'expliquerait par un effet dominant négatif de la mutation *Lp* (Yin et al., 2012). Cette étude met aussi en évidence une fonction redondante entre les protéines Vangl1 et Vangl2 au cours du développement. Cependant, cette fonction n'avait pas pu être analysée en post-natal car les souris *vangl2 KO* meurent à la naissance à cause de la craniorachischisis. Dans ce but, le Dr Copley a généré une souris transgénique mutée pour *vangl2* afin de limiter la délétion de *vangl2* à l'oreille interne et d'éviter une craniorachischisis (Copley et al., 2013). Chez ce mutant, il démontre que le gradient de sévérité du phénotype PCP présent de la base vers l'apex, précédemment observé par le Dr Montcouquiol (Montcouquiol et al., 2003), était restauré en post-natal (Copley et al., 2013). En

effet, il observe que la mauvaise orientation sévère des CC les plus externes présente à la naissance était en partie restaurée vers le stade post natal 5 (P5). Il corrèle cette réorientation des CC avec l'augmentation de l'expression de Vangl1 entre P0 et P5.

Des études consécutives aux deux premiers papiers (Curtin et al., 2003; Montcouquiol et al., 2003) et toujours sur les épithéliums de l'oreille interne ont permis de montrer que la distribution asymétrique planaire de la plupart des protéines de la PCP était également conservée chez les mammifères, soulignant à nouveau l'intérêt de ce modèle d'étude. Pour autant, la distribution des protéines n'est pas nécessairement un reflet parfait de ce que l'on peut observer chez la drosophile (*figure 9*). En effet, dans l'aile de drosophile, Vang et Pk sont accumulées au pôle distal, Dvl, Fz et Diego au pôle proximal, et Fmi à la fois aux pôles distal et apical (Ezan and Montcouquiol, 2013). Cependant, chez les mammifères cette même distribution asymétrique n'est pas toujours retrouvée. En effet, si nous prenons l'exemple des CC au niveau de la cochlée, on retrouve au pôle proximal Fz3/Fz6, Ankrd6 et Celsr1 (Copley et al., 2013; Duncan et al., 2017; Giese et al., 2012; Jones et al., 2014; Montcouquiol et al., 2003, 2006; Torban et al., 2008; Wang et al., 2006; Yin et al., 2012), et Dvl2/3 au pôle distal (Wang et al., 2005). Vangl2 semble préférentiellement enrichie du côté distal des cellules de soutien (CS) à la jonction avec les CC, mais aussi à toutes les jonctions proximo-distales des CS dans les épithéliums cochléaire et vestibulaire (Ghimire et al., 2018; Giese et al., 2012; Montcouquiol et al., 2003). De façon inattendue, l'expression de Pk2 est absente de l'organe de Corti, bien qu'elle soit présente dans la région non sensorielle médiale de l'épithélium, où elle est distribuée de façon asymétrique mais perpendiculaire à l'axe PCP proximo-distal (Copley et al., 2013; Deans et al., 2007). En revanche, Pk2 est présente dans les épithéliums sensoriels vestibulaires, mais sa distribution suggère une accumulation similaire à Vangl2, à la jonction CC/CS du côté des CS et à la jonction CS/CS (Deans et al., 2007). Enfin, le profil d'expression d'Ankrd6 est similaire à celui de Vangl2 dans l'épithélium vestibulaire (*figure 9*) (Jones et al., 2014).

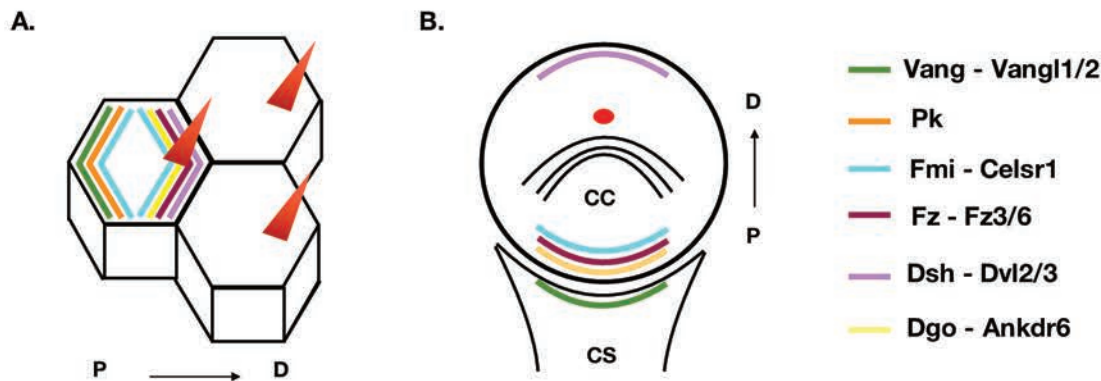


Figure 9 : Représentation schématique de l'expression des protéines centrales de la PCP dans l'aile de drosophile et dans l'épithélium cochléaire. (A) Représentation schématique des cellules de l'aile de drosophile avec l'expression de Van gogh (Vang - vert), Prickle (Pk - orange) et Flamingo (Fmi - bleu) au niveau proximal et de Dishevelled (Dsh - rose), Frizzled (Fz - violet), Diego (Dgo - jaune) et Fmi au niveau distal. **(B)** Représentation schématique d'une cellule ciliée (CC) et d'une cellule de soutien (CS) avec une expression de Dishevelled 2/3 (Dvl2/3) au niveau du pôle distal de la CC, de Celsr1 (homologue de Fmi chez les mammifères), Fz3/6 et Ankr6 (homologue de Dgo chez les mammifères), au pôle proximal de la CC, et de Vangl1/2 au pôle distal de la CS. D : Distal, P : Proximal. Courbes noires : Touffe ciliaire, Points rouges : Kinocils, Triangle rouge : Trichome.

Une observation commune pour Vangl2, Pk2, Celsr1 et Ankr6 est que la distribution asymétrique de ces trois protéines ne change pas au niveau de la zone de réversion dans le système vestibulaire (voir chapitre II : Le système auditif) (Deans et al., 2007; Duncan et al., 2017; Jones et al., 2014; Stoller et al., 2018; Warchol and Montcouquiol, 2010). Dans cette zone de réversion, la polarité des CC change à 180°C, séparant le tissu en une zone proximale et une zone distale de PCP opposée. Plus simplement, ces études démontrent que l'asymétrie de ces protéines n'est pas corrélée à la position du kinocil dans l'épithélium. Or, le dogme était que les protéines de la PCP déterminaient la position du cil, puis de la touffe ciliaire. Ces apparentes contradictions conduiront à l'étude d'un autre complexe protéique important dans la PCP : le complexe Gpsm2/Gai3.

c. Protéines associées à la PCP

A la grande différence des invertébrés, l'évolution a fait apparaître chez les mammifères des protéines associées à la PCP indispensables à la mise en place de cette polarité. La majorité de ces gènes ont été découverts en se basant sur le phénotype de défaut de fermeture du tube neural, et plus tard validés par la présence d'un défaut de polarité dans l'oreille interne. Grâce aux travaux du Dr Montcouquiol en 2003, la protéine Scribble a été l'une des premières protéines associées à la PCP (Montcouquiol et al., 2003). Le double mutant hétérozygote *vangl2* et *Scribble*

présente une craniorachischisis ainsi qu'un défaut de PCP dans l'oreille interne. Systématiquement, la mutation des gènes centraux de la PCP engendre des phénotypes plus sévères que la mutation des gènes associés à la PCP. De plus, la majorité des protéines associées à la PCP ne partagent pas les mêmes caractéristiques que les protéines centrales de la PCP. En effet, les protéines associées à la PCP (1) ne sont pas distribuées asymétriquement au sein de la CC, (2) ne perturbent pas systématiquement la localisation de protéines centrales de la PCP lorsqu'elles sont mutées, (3) et n'engendrent souvent que de légers phénotypes PCP limités à la dernière rangée, la plus distale, des CC. Au niveau de l'oreille interne, d'autres gènes associés à la PCP sont décrits : *Ptk7*, *Ror2*, *Cthrc*, *Sec24b*, *Smurf1/2*, *Chuzhoi*, *Wnt5a*, *Fat1-4*, *Dchs1/2* et *Fjx1* (Lu et al., 2004; Mao et al., 2011; Montcouquiol et al., 2003; Narimatsu et al., 2009; Paudyal et al., 2010; Qian et al., 2007; Saburi et al., 2008; Wansleeben et al., 2010; Yamamoto et al., 2008).

4. Une autre voie de signalisation de la PCP : Division asymétrique et fonction post-mitotique

C'est en 1884 pour la première fois que le Dr Hertwig découvre la division asymétrique. Pour cela, il analyse des œufs d'oursin qui ont la particularité d'être petits, transparents et sans membrane nucléaire. Grâce à ce système, il découvre une modification de l'orientation du fuseau de division en réponse à des forces mécaniques. Ce n'est qu'un siècle plus tard, en 1995, que les premiers facteurs régulant l'orientation du fuseau mitotique sont découverts. Un défaut de ce processus est directement en lien avec des pathologies telles que la lissencéphalie (l'absence de repliement externe du cerveau), la microcéphalie (cerveau plus petit que la normal), des maladies rénales comme la polykystose ou encore des cancers.

Tous les êtres pluricellulaires ont deux challenges au cours de leur développement : (1) générer une diversité cellulaire et (2) former un tissu en trois dimensions, le tout à partir d'une seule cellule. Lors de la mise en place de l'organisme, une division est dite symétrique lorsqu'elle engendre des cellules filles au devenir identique. Alors qu'à l'inverse, une division est dite asymétrique lorsque qu'elle donne naissance à deux cellules avec un devenir différent. Les divisions asymétriques permettent donc une diversification cellulaire tout en maintenant des cellules souches. Suite à ces divisions, une morphogénèse du tissu est mise en place par l'arrangement de ces différentes cellules entre elles. La perturbation de ces mécanismes ne permettra pas d'aboutir à un organisme viable. La division asymétrique, en plus d'être essentielle à la mise en place de l'organisme au cours de l'embryogenèse, permet le contrôle de la

prolifération, du devenir, et de l'organisation cellulaire au sein d'un tissu à toute période de la vie. De ce fait, ce processus permet aussi à l'organisme adulte de maintenir une certaine homéostasie en maintenant des cellules souches pour une réparation du système en cas de dommage.

La mise en place de cette division asymétrique nécessite l'expression asymétrique de complexes protéiques au cortex de la cellule. Cette organisation va guider le positionnement et l'orientation du fuseau mitotique afin d'aboutir à une division asymétrique. Cette division va permettre une ségrégation différentielle des déterminants cellulaires entre la cellule mère et la cellule fille générée, à l'origine d'un devenir différent de celles-ci. Dans ce mécanisme, les protéines centrales de la PCP ont été décrites comme jouant un rôle déterminant (Gomes et al., 2009), mais une autre voie de signalisation intervient aussi, qui fait intervenir le complexe protéique Gpsm2/G α i (Colombo et al., 2003; Peyre et al., 2011). En fonction des espèces, les protéines de cette voie de signalisation conservée au cours de l'évolution ne portent pas toujours le même nom (*tableau 1*).

C. Elegans	Drosophile	Vertébrés
Complexe Gpsm2/G α i		
GPR-1 et 2	Pins	mPins, Gpsm2 ou LGN
GOA-1 et GPA-15	G α i	G α i1, 2 et 3
LIN-5	Mud	NuMA
-	dInsc	mInsc/Insc
Complexe Par		
Par-3	Bazooka	Par-3
Par-6	DmPar6	Par-6
PKC-3	DaPKC	aPKC, PKC ζ

Tableau 1 : Résumé des différents noms des protéines des complexes Par et Gpsm2/G α i en fonction des espèces.

a. La machinerie derrière la division asymétrique chez les invertébrés

Les protéines régulant la division asymétrique chez les invertébrés ont été très étudiées lors de la première division du *C. elegans* ou lors de la division des neuroblastes et des organes sensoriels (SOP) chez la drosophile. Ces facteurs permettent (1) d'établir une polarité de la cellule afin d'orienter les déterminants cellulaires et (2) d'aligner le fuseau mitotique de division. Pour cela, ces protéines sont enrichies de façon asymétrique au cortex de la cellule et permettent le recrutement de partenaires afin de faire un lien entre le cortex de la cellule et le cytosquelette de

tubuline. Ces protéines ancrées à la membrane vont alors exercer une force de tension afin d'orienter le fuseau mitotique de division. Cette machinerie est conservée au cours de l'évolution et fait appel à différents complexes protéines dont le complexe Gpsm2/Gai.

- **La première division du *C. elegans***

Lors de la première division du *C. elegans*, le complexe Par3/Par6/PKC-3 accumulé au pôle antérieur et le complexe GPR1-2 (G proteins regulator 1-2) /LIN-5 (Abnormal cell linéale-5) /GOA-1/GPA-15 et Par1/Par2 accumulés au pôle postérieur s'opposent au cortex de la cellule et permettent de polariser la cellule selon l'axe antéro-postérieur (*figure 10*). Lors de la division asymétrique, la répartition asymétrique des déterminants cellulaires va conduire à une forme et un devenir différent de ces cellules filles générées (*figure 10A*) (Bergstrahl et al., 2017; Park and Rose, 2008).

- **Division des neuroblastes chez la drosophile**

Lors de la division des neuroblastes chez la drosophile, la division asymétrique est indispensable pour maintenir à la fois les cellules souches de ce tissu mais aussi donner une cellule fille qui donnera naissance à une cellule du système nerveux : le ganglion. Dans ce mécanisme, l'organisation de la machinerie de la division asymétrique est légèrement différente de celle lors de la première division du *C. elegans*. En effet, dans ce système trois complexes sont nécessaires : (1) le complexe apical Par formé de Bazooka/DmPar6/DaPKC, (2) le complexe apical Pins (Partner of INScuteable,) / Gai / Mud (MUshroom body Defective) / dlncsc (drosophile INScuteable) pour orienter le fuseau mitotique, et (3) le complexe basal composé de Mira (MIRAnda), Pros (PROSpero), Brat (BRAIn Tumor) et Numb (*figure 10B*) (Lu and Johnston, 2013). Dans ce modèle, le premier complexe à s'établir est le complexe Bazooka/DmPar6/DaPKC ancré à la membrane par le biais de Bazooka accumulée au pôle apical de la cellule (Kuchinke et al., 1998). Par l'intermédiaire de Bazooka, ce complexe va ensuite recruter dlncsc qui, à son tour, va recruter Pins/Gai (Kraut et al., 1996; Schaefer et al., 2000; Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999). La forme GDP de Gai ancrée à la membrane grâce à des myristoylations va alors stabiliser ce complexe à la membrane. Ainsi stabilisé, Pins va faire le pont entre le cortex de la cellule et les asters de microtubules en se liant à Mud (Bowman et al., 2006; Siller et al., 2006). Cette dernière va alors se lier directement aux microtubules en interagissant avec la Dyneine (*figure 10B*). Ce complexe va permettre d'exercer une force de traction afin d'orienter le fuseau de division mitotique pour qu'il soit perpendiculaire à l'axe apico-basal. Lors de la division, les cellules

auront des formes et des compositions différentes qui vont permettre de définir leur devenir. En effet, la cellule la plus apicale, composée des complexes Bazooka/DmPar6/DaPKC et dlncsc/Pins/Gai/Mud, donnera naissance à un neuroblaste permettant le renouvellement des cellules souches du tissu, alors que le pôle basal possédant le complexe Mira/Pros/Brat/Numb donnera naissance au ganglion mère.

b. La machinerie derrière la division asymétrique chez les vertébrés et les mammifères

La machinerie mise en place chez les invertébrés est conservée chez les vertébrés et est très étudiée au niveau de la division asymétrique des cellules de l'épiderme et des progéniteurs neuronaux chez la souris.

- **Cellules épithéliales de la peau**

Entre E13,5 et E17,5 chez la souris, l'épiderme, alors formé d'une seule couche de progéniteurs, va se développer pour former un épithélium stratifié de cellules différenciées. La division asymétrique s'avère être essentielle pour la morphogenèse de ce tissu. De façon similaire au mécanisme décrit chez les invertébrés, le complexe Par3/Par6/aPKC va recruter mInsc par l'intermédiaire de Par3 (*figure 10C*). Ce complexe va alors pouvoir recruter le complexe Gpsm2/Gai qui va à son tour se lier à NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus protein). NuMA, homologue de Mud chez les vertébrés, se lie aux asters de microtubules par l'intermédiaire de la Dynéine afin d'orienter le fuseau de division mitotique (Lechler and Fuchs, 2005) (*figure 10C*).

- **Division neuronale**

Contrairement aux cellules épithéliales de la peau, le mécanisme de division asymétrique au niveau des progéniteurs neuronaux est plus complexe. Ces progéniteurs sont des cellules bipolaires qui comportent un pied fin attaché à la surface apicale de la zone ventriculaire et un long prolongement cytoplasmique qui vient faire contact avec le pôle basal du cortex (*figure 10D*). Au cours de la neurogénèse embryonnaire, ces cellules vont donner naissance aux différentes populations neuronales du cortex cérébral. A E13,5, pendant la phase initiale de prolifération, ces cellules vont se multiplier et générer d'autres cellules progénitrices en se divisant de façon symétrique (division planaire). Puis, entre E13,5 et E15,5, pendant le pic de neurogénèse, ces cellules progénitrices vont basculer vers un mode de division asymétrique (ou oblique), leur permettant de générer à la fois un nouveau progéniteur et un neurone qui va migrer vers le pôle

basal du cortex. Pour cela, les protéines du complexe Par sont connues pour être exprimées au niveau du pôle apical, alors que le complexe Gpsm2/Gai/NuMa/Insc est accumulé au niveau proximal et distal de la cellule progénitrice (*figure 10D*). Une division asymétrique va conduire à une répartition inégale de ces protéines qui aura pour conséquence d'aboutir à un devenir différent des cellules générées (*figure 10D*) (Mapelli and Gonzalez, 2012). Il a été démontré que les protéines Gpsm2, NuMA ou encore Insc sont indispensables à ce processus (Konno et al., 2008; Morin et al., 2007; Peyre et al., 2011). En effet, le Dr Konno en 2008 démontre que chez la souris mutée pour *Gpsm2* (*LGN^{Δc}* : absence du domaine C-terminal qui lie Gai) l'axe de division des cellules progénitrices est aléatoire, engendrant un épuisement des progéniteurs apicaux. Ce profil pourrait suggérer une production précoce de neurones pouvant générer des phénotypes tels que des lissencéphalies, mais aucune modification de l'architecture du cortex n'est observée. De plus, il remarque qu'il n'y a pas d'augmentation du nombre de neurones générés mais seulement une augmentation du domaine de progéniteurs vers le pôle basal. Il observe aussi que cette anomalie de distribution des progéniteurs neuronaux est observée lors d'une surexpression de Insc. Tout comme la mutation de *Gpsm2*, une surexpression de Insc augmente le nombre de divisions obliques des progéniteurs apicaux. Ensemble ces résultats suggèrent que le Gpsm2 favorise une division planaire alors que Insc serait plus favorable à une division oblique tout comme cela avait été démontré dans la rétine (Konno et al., 2008; Zigman et al., 2005).

c. Complexe Gpsm2/Gai/Insc versus Gpsm2/Gai/NuMA

Comme indiqué précédemment, l'orientation du fuseau de division mitotique nécessite l'enchaînement suivant : (1) Le complexe Par3/Par6/aPKC ancré à la membrane plasmique au pôle apical de la cellule va recruter et lier mInsc, (2) mInsc va alors interagir avec le complexe Gpsm2/Gai par l'intermédiaire de Gpsm2, (3) Gpsm2 va alors recruter et lier NuMA, (4) NuMA va alors se lier à la Dynéine connectée aux microtubules, et exercer une force de traction afin d'orienter le fuseau de division mitotique. Bien que les complexes Gpsm2/Gai/Insc et Gpsm2/Gai/NuMA soient tous les deux observés *in vitro*, la liaison simultanée de Insc et NuMA à Gpsm2 est impossible. Gpsm2 est une protéine composée de sept domaines TPR, d'un linker et de quatre domaines GoLoco (qui lient les protéines Gai) (*figure 23*). Cette protéine est connue pour adopter une conformation inhibitrice en se repliant sur elle-même (liaison des domaines GoLoco avec les domaines TPR). Les études du Dr Culurgioni et du Dr Du démontrent qu'à la fois Insc, NuMA et Gai ont la capacité d'ouvrir cette conformation inhibitrice de Gpsm2 pour la rendre active (Culurgioni et al., 2011; Du and Macara, 2004). Cependant, grâce à une mesure de la constante d'affinité il semblerait que la liaison à Insc soit favorisée par rapport à celle de NuMA.

Dans ce cas, comment ce passage du complexe Gpsm2/G α i/Insc au complexe Gpsm2/G α i/NuMA est-il possible ? Le Dr Culurgioni émet alors l'hypothèse du schéma suivant : (1) Insc se lie à la membrane par l'intermédiaire de Par3 ce qui permet de recruter Gpsm2, (2) cette conformation ouverte de Gpsm2 par Insc va favoriser sa liaison à G α i-GDP liée à la membrane apicale, (3) puis, une protéine encore inconnue à ce jour va permettre le décrochage d'Insc de Gpsm2 pour favoriser une liaison à NuMA. Ce complexe transitoire formé de Gpsm2, G α i et NuMA va alors se lier aux microtubules par l'intermédiaire de la Dynéine et engendrer une force de traction sur le fuseau mitotique de division vers le cortex apical de la cellule, (5) puis, un facteur d'échange de guanine tel que RIC8A, va permettre d'échanger le GDP de G α i en GTP engendrant la dissolution de ce complexe, (6) un nouveau cycle peut alors être engagé (Culurgioni et al., 2011).

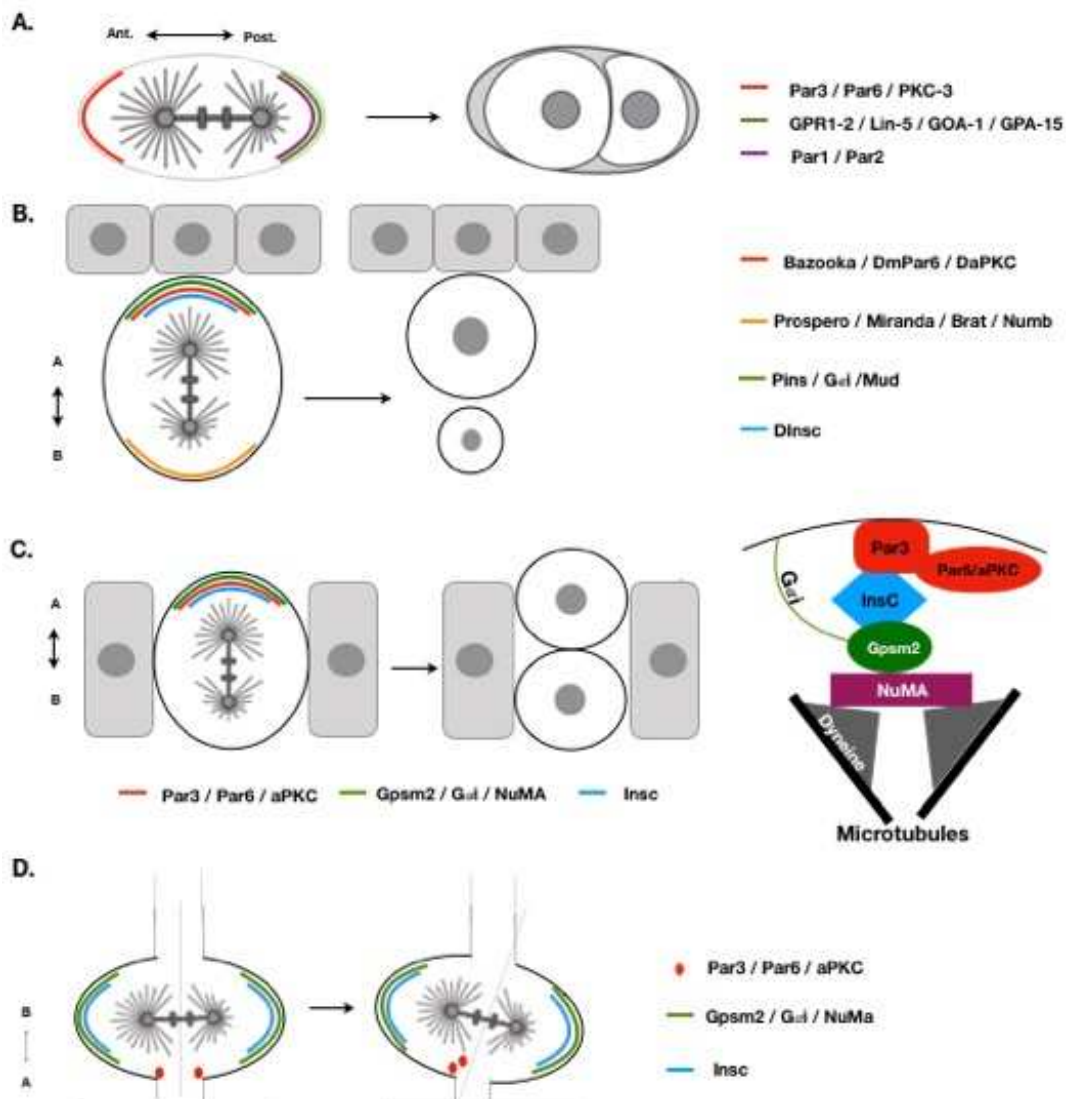


Figure 10 : Représentation schématique de la division asymétrique dans différents modèles d'études. (A) Représentation schématique de la première division chez le *C. elegans*. Dans ce système, le complexe Par3/Par6/PKC-3 est exprimé au pôle antérieur de la cellule, et le complexe GPR1-2 / Lin-5 / GOA-1 / GPA-15 et Par1/Par2 est exprimé au pôle postérieur. Après division asymétrique les cellules ont des formes différentes qui leur confèrent des devenirs différents ; **(B)** Représentation schématique de la division asymétrique chez le neuroblaste de drosophile. Dans ce système, les complexes Bazooka/DmPar6/DaPKC, Pins/Gai/Mud et DInsc sont exprimés au pôle apical alors que le complexe Prospero/Miranda/Brat/Numb est exprimé au pôle basal. Cette répartition asymétrique de ces protéines va aboutir à une division asymétrique qui va conduire à un devenir différent des cellules générées ; **(C)** Représentation schématique de la division asymétrique dans une cellule épithéliale de la peau chez les mammifères. Dans ce système, les complexes Gpsm2/Gai/NuMA, Par3/Par6/aPKC et Insc sont exprimés au pôle apical de la cellule. Cette répartition va permettre une division asymétrique ; **(D)** Représentation schématique d'une division asymétrique d'une cellule progénitrice neuronale chez les mammifères. Dans ce système, le complexe Par3/Par6/aPKC est localisé au pôle apical, et le complexe Gpsm2/Gai/NuMA et Insc sont accumulés aux niveaux proximal et distal de la cellule. Cette accumulation va conduire à une répartition inégale des protéines au sein de la cellule et donc à un devenir différent des cellules après division asymétrique. (adapté de (Lu and Johnston, 2013; Paridaen and Huttner, 2014a))

d. Fonctions post-mitotiques de la voie de signalisation de la PCP dépendante de Gpsm2/G α i

Chez les mammifères, le complexe Gpsm2/G α i n'intervient pas uniquement lors de l'orientation du fuseau mitotique au cours de la mitose mais il régule aussi l'arrangement du cytosquelette de cellules post-mitotiques. Comme par exemple lors du mouvement des cellules du système immunitaire (chemotactisme) (Kamakura et al., 2013), de la morphogenèse des synapses (Sans et al., 2005) ou encore du développement des CC de l'oreille interne (Ezan et al., 2013).

- **Rôle synaptique**

Les protéines impliquées dans la division asymétrique ont également été retrouvées au niveau de la régulation synaptique. Les synapses correspondent au point de connexion entre un neurone et sa cible. Cette structure est composée d'un domaine pré et post synaptique avec une fente synaptique qui sépare ces deux domaines. La majorité des synapses sont excitatrices et possèdent au niveau de la membrane de leur domaine post synaptique des récepteurs glutamatergiques dont les récepteurs NMDA (N-Methyl-D-Aspartate). Ces récepteurs sont indispensables au développement cérébral, à l'apprentissage et à la mémoire. Par conséquent, la perturbation du nombre et de la localisation de ces récepteurs a été décrite comme étant en lien avec des pathologies psychiatriques (Peyrovian et al., 2019). Il a été démontré que le complexe Gpsm2/G α i jouait un rôle dans la régulation du trafic de ces récepteurs au niveau de la membrane synaptique. Dans ce mécanisme, notre équipe a mis en évidence que SAP102 (aussi appelée Dlg3) se lie à la conformation fermée de Gpsm2. SAP102, une protéine faisant partie de la famille des MAGUK connue pour être indispensable pour l'architecture des synapses, va alors former un complexe avec les vésicules de recyclage des récepteurs NMDA (NMDAR). Ce complexe alors formé de Gpsm2/SAP102/NMDAR va conduire à l'ouverture de la conformation inhibitrice de Gpsm2 pour permettre une interaction de Gpsm2 avec G α i ancrée à la membrane. La stabilisation de ce complexe à la membrane par G α i est d'autant plus vraie que l'expression d'une forme tronquée de Gpsm2, ne possédant plus les sites d'interaction pour G α i, conduit à une dégradation rapide du complexe Gpsm2/SAP102/NMDAR et par conséquent à une diminution du nombre de récepteurs NMDA à la membrane plasmique synaptique (Sans et al., 2005).

- **Migration du cil et morphologie des CC de l'oreille interne**

En 2008 et 2011, les équipes des Dr Chen et Dr Lu montrent que l'inactivation de *Ift88* (Intraflagellar 88) ou *Kif3A* (Kinesin Family member 3A) conduit à une absence du kinocil et un défaut d'orientation et de forme de la touffe ciliaire, liant les gènes ciliaires à la PCP (Jones et al., 2008; Sipe and Lu, 2011). Cependant, contrairement aux phénotypes dus à une mutation des gènes PCP centraux la distribution asymétrique des protéines centrales de la PCP n'est pas affectée (Jones et al., 2008; Okamoto et al., 2017; Sipe and Lu, 2011). Ainsi, l'inactivation des gènes ciliaires conduit à un phénotype PCP « faible » sans affecter la distribution asymétrique des protéines centrales de la PCP, ce qui renforce l'idée que les gènes centraux de la PCP ne sont pas les uniques facteurs décisifs qui permettent le positionnement du kinocil et par conséquent l'orientation de la touffe ciliaire au sein de la CC. Cette idée était renforcée par le fait que *vangl2*, *Celsr1*, *Pk2* et *Ankrd6* ne changent pas leur asymétrie au niveau de la zone de réversion dans le système vestibulaire (Deans et al., 2007; Duncan et al., 2017; Jones et al., 2014; Stoller et al., 2018; Warchol and Montcouquiol, 2010). Ainsi, en 2013, notre équipe a émis l'hypothèse qu'une autre voie de la PCP, alors appelée voie de la PCP dépendante des protéines Gi, serait indispensable à la mise en place et à la migration translationnelle (migration au pôle distal) du kinocil à la surface apicale de la CC (Ezan et al., 2013). Un complexe composé de *Gpsm2* et *Gai3* et accumulé au pôle distal à la surface apicale de la CC est alors mis en évidence. Ce complexe exercerait une force de traction sur le cytosquelette de tubuline émanant du kinocil, permettant ainsi une migration dirigée du kinocil au pôle distal de la CC (*figure 11*) (Ezan et al., 2013; Tarchini et al., 2013). De plus, le profil d'expression spatio-temporel de ces protéines coïncide parfaitement avec la migration du kinocil. En effet, dès E15,5, *Gai3* est accumulée au centre de la CC avant d'acquérir une expression asymétrique distale à la surface apicale. Cette expression se fait donc en amont de la migration translationnelle. De plus, contrairement aux protéines centrales de la PCP, dans l'épithélium vestibulaire, *Gpsm2* et *Gai3* changent d'orientation au niveau de la zone de réversion et cette position corrèle parfaitement avec la position du kinocil. Ces données sont d'autant plus excitantes qu'elles mettent aussi en avant le fait que le rôle de ce complexe dans la division asymétrique des cellules lors du positionnement du fuseau de division est transposable aux cellules post-mitotiques en contrôlant la position du cil primaire par modulation du cytosquelette de tubuline (Ezan et al., 2013; Tarchini et al., 2013).

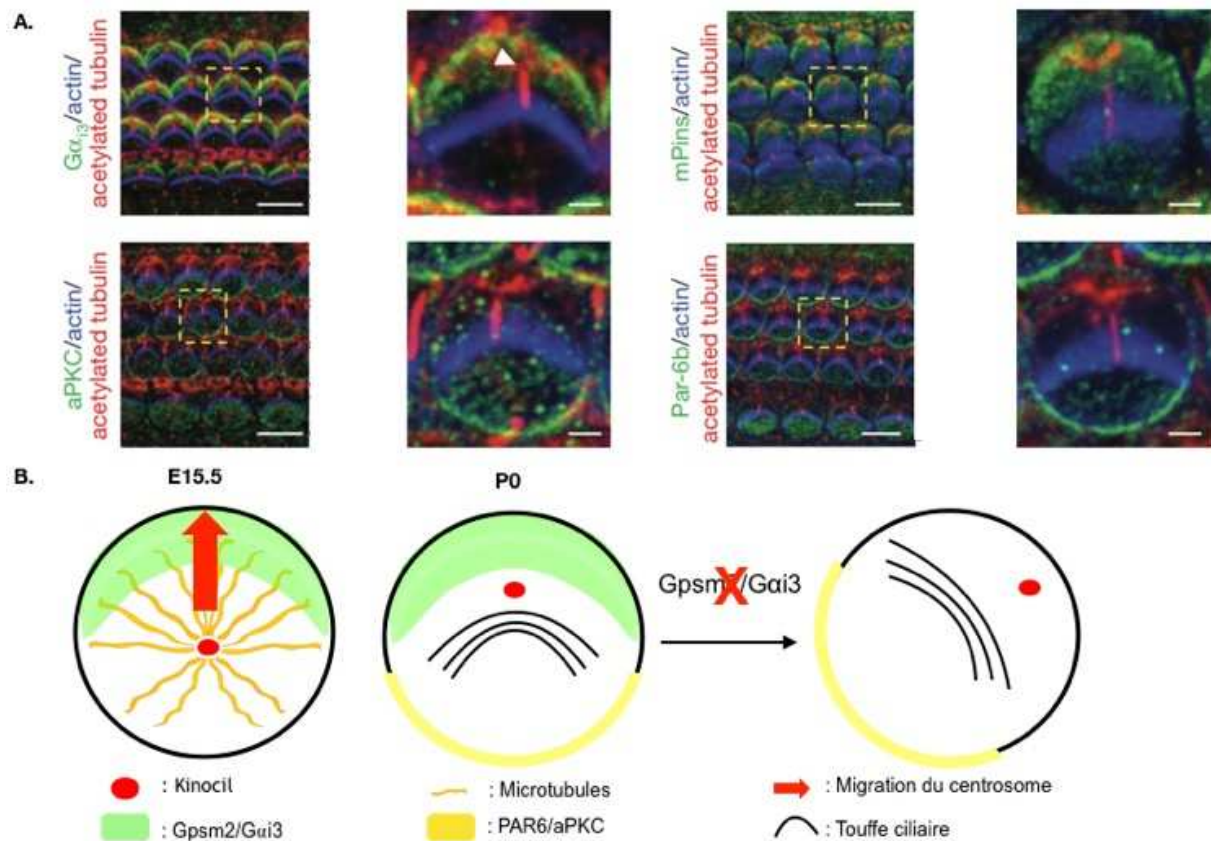


Figure 11 : Le complexe Gpsm2/Gai3 est essentiel au positionnement du kinocil et à la morphologie de la touffe ciliaire. (A) Vue de surface de l'épithélium auditif à P0/P1. Ces immunomarquages mettent en évidence une distribution asymétrique de Gpsm2 et Gai3 au pôle distal à la surface apicale de la CC. A l'inverse aPKC et Par6b sont exprimées de façon asymétrique au pôle proximal à la surface apicale de la CC ; (B) Représentation schématique de l'expression de Gpsm2 et Gai3 au cours du développement. A E15,5 chez la souris, Gpsm2 et Gai3 sont exprimées de façon asymétrique au pôle distal à la surface apicale de la CC. Ce complexe Gpsm2/Gai3 va alors exercer une force de traction sur le cytosquelette de tubuline et permettre une migration du kinocil au pôle distal de la cellule. En absence de Gpsm2 et Gai3, le kinocil est mal positionné à la surface apicale de la CC et la touffe ciliaire est aplatie et mal orientée. (adapté de (Ezan et al., 2013))

Chapitre II : Le système auditif

A. Définitions et généralités

L'oreille fait partie de l'un des cinq organes des sens. Elle se compose de trois parties : L'oreille externe, moyenne et interne (figure 12).

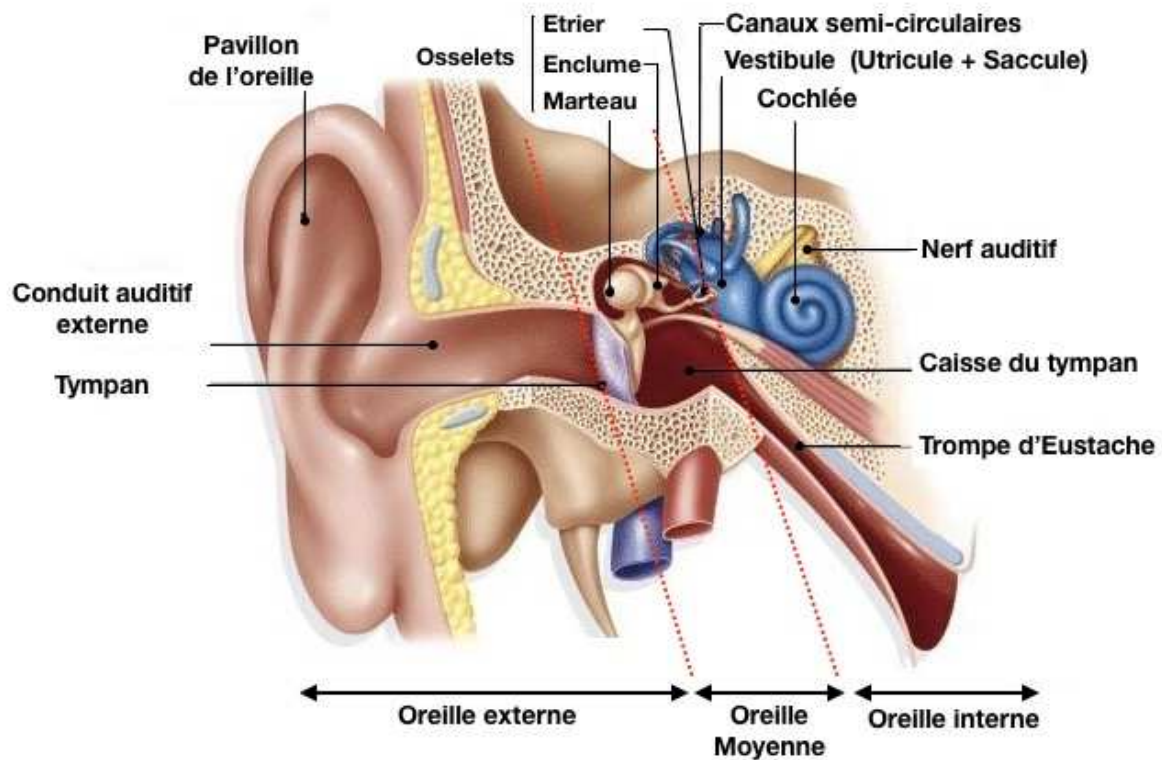


Figure 12 : Représentation schématique du système auditif. (adapté de *idpassport.me*)

B. Oreille externe

L'oreille externe fait référence à la partie externe et visible de l'oreille composée du pavillon et du conduit auditif. Le pavillon est une structure cartilagineuse qui a pour but de capter et concentrer les ondes sonores vers le conduit auditif. Chez certaines espèces, comme par exemple le chat et le chien, le pavillon peut être mobilisé pour orienter l'ouïe et capter des sons dans différentes directions. Le conduit auditif, d'une longueur de 2,5 cm chez l'homme, est enchâssé dans une cavité creusée dans l'os temporal composé d'un squelette cartilagineux et de glandes sébacées et sudoripares qui sécrètent le cérumen pour le protéger. L'oreille externe a pour rôle de capter, amplifier et focaliser les sons vers l'oreille moyenne (figure 12).

C. Oreille moyenne

L'oreille moyenne est séparée d'une part de l'oreille externe par le tympan, une fine membrane semi-rigide qui a une fonction de récepteur aux ondes sonores, et d'autre part de l'oreille interne par la fenêtre ovale. La communication entre l'oreille moyenne et l'oreille interne est réalisée par la chaîne des osselets composée du marteau, de l'enclume et de l'étrier. Ces os, connus pour être les plus petits os du squelette humain, permettent la transmission mécanique des ondes sonores captées par le conduit auditif vers l'oreille interne. Cependant, la vibration du tympan ne peut se faire que si la pression de l'oreille moyenne est proche de celle de l'air ambiant. Pour maintenir cet équilibre de pression, la trompe d'Eustache qui relie l'oreille moyenne à la cavité buccopharyngée, module son ouverture lors des variations de pression. Pour cela, la partie cartilagineuse de la trompe d'Eustache forme une valve qui protège l'oreille interne des fluctuations de pression au cours de la respiration et empêche que les vibrations de la voix soient directement transmises à l'oreille moyenne (*figure 12*).

D. Oreille interne

L'oreille interne est un labyrinthe membraneux, composé de cellules épithéliales, entouré d'un labyrinthe osseux qui le protège. A maturité chez l'homme, elle mesure 2,5 cm de long et 0,7 cm de diamètre. L'oreille interne, enchâssée dans l'os temporal, est orientée selon les trois plans de l'espace (Bok et al., 2007; Wu and Kelley, 2012) :

- L'axe Antéro-Postérieur (A-P) ;
- L'axe Dorso-Ventral (D-V) ;
- Et l'axe Proximo-Distal (P-D).

L'oreille interne est subdivisée en deux régions, une région dorsale composée du système vestibulaire, l'organe de l'équilibre, et une région ventrale qui comprend la cochlée, le système auditif (*figure 12*).

1. Le système Vestibulaire

Le système vestibulaire constitue l'organe de l'équilibre et de l'orientation dans l'espace. Cet organe est composé de cinq structures : trois canaux semi-circulaires, le saccule et l'utricle (*figure 12*).

a. Canaux semi-circulaires

Les canaux semi-circulaires, au nombre de trois, possèdent une organisation orthogonale entre eux leur permettant de percevoir des rotations et les accélérations angulaires de la tête dans les trois plans de l'espace. A la base de chaque canal se situe la crête ampullaire qui renferme les CC. La surface apicale de ces CC est coiffée de long stéréocils d'actine organisés en taille croissante enchâssés à leur sommet dans une substance gélatineuse, la cupule. L'ensemble de ces CC sont orientées dans la même direction et réparties le long de la crête ampullaire de forme concave.

b. Saccule et Utricule

Le saccule et l'utricule sont deux structures orientées perpendiculairement l'une par rapport à l'autre permettant la détection des accélérations linéaires dans les deux plans de l'espace. Ces deux structures planes sont composées d'un ensemble de CC coiffées à leur surface apicale de stéréocils d'actine. La particularité de ces deux organes est qu'ils peuvent être subdivisés en deux régions délimitées par la ligne médiane, appelée striola. Au niveau de cette délimitation l'orientation des CC s'inverse à 180° (figure 13). Dans le saccule les CC changent d'orientation et s'opposent au niveau de la striola alors qu'à l'inverse elles se font face dans l'utricule. Cette organisation bien particulière permet de capter les accélérations dans le plan horizontal pour l'utricule et vertical pour le saccule (figure 13).

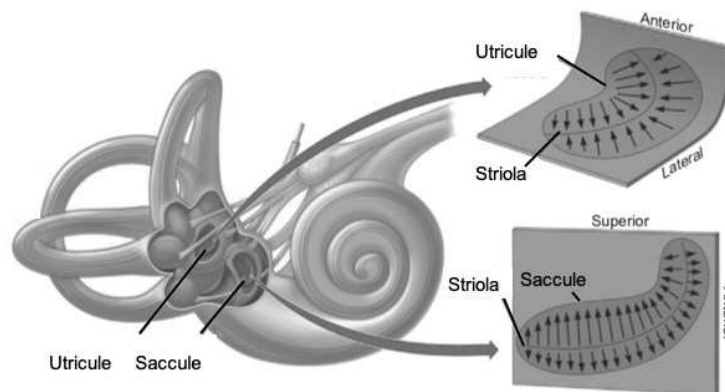


Figure 13 : Représentation schématique de l'orientation des CC au sein de l'utricule et du saccule. (adapté de (Merfeld, 2015))

2. Le système cochléaire ou cochlée

a. Organisation fonctionnelle

La cochlée constitue la partie auditive de l'oreille interne. L'architecture ainsi que le nom de cet organe varient d'une espèce à une autre. Chez les oiseaux, ce système est appelé papille basilaire et possède une forme légèrement incurvée, chez les poissons c'est un organe linéaire appelé ligne latérale, alors que chez les mammifères, on l'appelle cochlée et elle possède une forme caractéristique en spirale.

Chez les mammifères, cet organe enchâssé dans l'os temporal s'enroule sur lui-même. Le nombre d'enroulements de la cochlée diffère aussi d'une espèce à l'autre. Chez l'homme on dénombre deux tours et demi, chez le cochon d'Inde trois, et chez la souris deux tours et trois quarts. La cochlée est séparée et isolée de l'oreille moyenne par : (1) la fenêtre ovale et (2) la fenêtre ronde. Grâce à sa communication directe avec l'oreille moyenne et la trompe d'Eustache, la fenêtre ronde a pour rôle de réguler la pression interne du canal cochléaire. La fenêtre ovale est liée à l'étrier et permet la propagation des vibrations de l'onde sonore au système liquidien de l'oreille interne. En effet, l'oreille interne est constituée de trois rampes liquidiennes qui s'enroulent autour d'un axe osseux appelé le Modiolus. Ces rampes sont :

- La rampe vestibulaire, située en partie dorsale, qui correspond au prolongement de la fenêtre ovale sur laquelle s'appuie l'étrier ;
- La rampe tympanique, située en position ventrale, qui fait suite à la fenêtre ronde ;
- Et, le canal cochléaire, qui renferme l'épithélium auditif appelé Organe de Corti. Ce canal est séparé de la rampe vestibulaire par la membrane de Reissner et de la rampe tympanique par la membrane basilaire (*figure 14*).

La cochlée est un organe creux contenant deux liquides aux propriétés bien différentes : la périlymphe et l'endolymphe (*figure 14*). La périlymphe est un milieu extracellulaire contenu dans les chambres vestibulaire et tympanique. Sa composition proche du liquide céphalorachidien est riche en sodium et pauvre en calcium et potassium. Ce fluide serait produit localement à partir du plasma sanguin et passerait la barrière des capillaires sanguins. Ces deux rampes communiquent entre elles à l'apex de la cochlée par l'hélicotrème. A l'inverse, le canal cochléaire, renferme de l'endolymphe, un milieu extracellulaire particulier. Sa composition est riche en potassium et pauvre en sodium et calcium. Le processus de production de l'endolymphe et la maintenance des concentrations de ses différents ions ne sont pas encore totalement élucidés. Il semblerait que la strie vasculaire riche en vaisseaux sanguins joue un rôle dans le maintien de la composition en

ions potassiques et sodiques de l'endolymphe (Zdebik et al., 2009). Sachant que le labyrinthe membraneux est un système clos, la question de flux et de renouvellement du fluide se pose. Il est suggéré que l'endolymphe soit réabsorbée par le sac endolymphatique (Raphael and Altschuler, 2003). Ce sac, qui s'étend dans la partie postérieure de l'oreille interne, va directement communiquer avec le SNC (Système Nerveux Central) et se remplir de liquide céphalorachidien. La composition de ce fluide va être modifiée dans ce sac afin de former l'endolymphe qui va être redistribuée dans le canal cochléaire (Barald and Kelley, 2004). La différence de composition de ces fluides permet la mise en place d'un gradient électrochimique favorable au fonctionnement de l'épithélium auditif (*figure 14*).

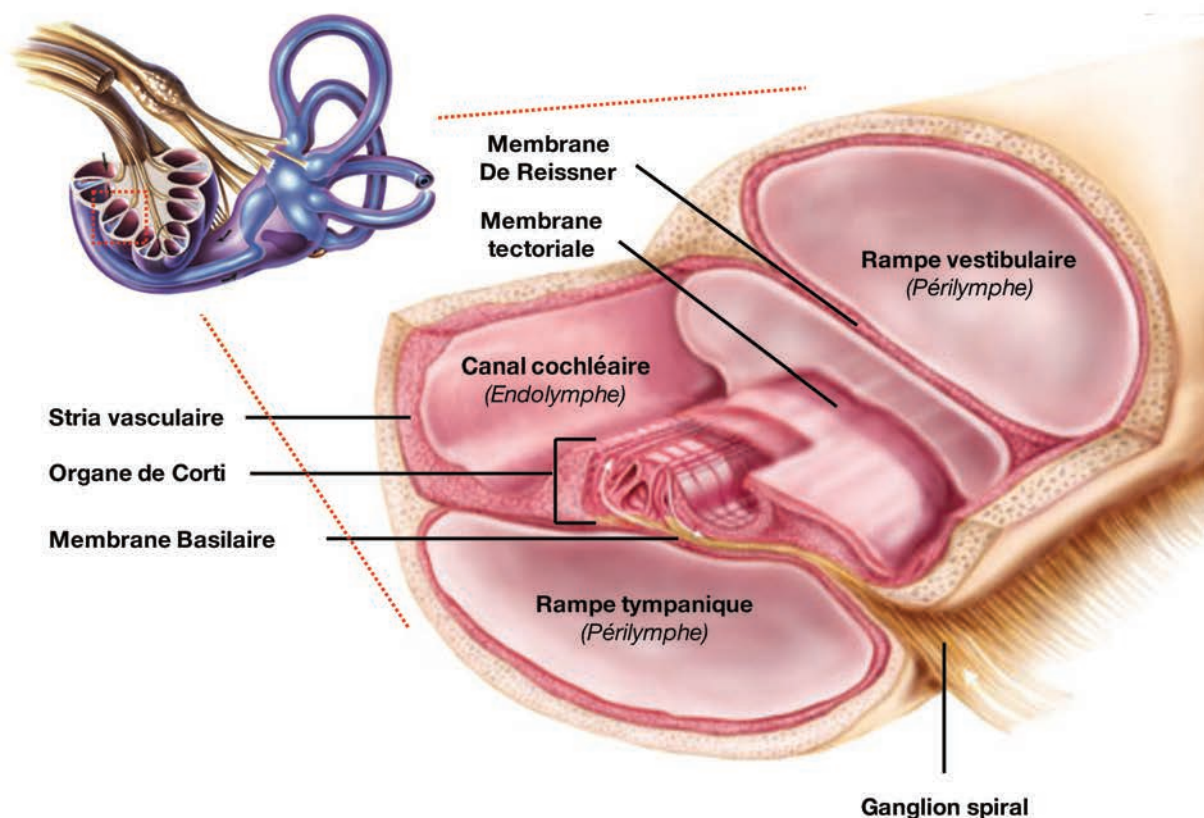


Figure 14 : Représentation schématique d'une coupe transverse de la cochlée. La cochlée est composée de trois chambres liquidiennes, la rampe vestibulaire, la rampe tympanique et le canal cochléaire qui contient l'épithélium auditif, aussi appelé organe de Corti. Cet épithélium repose sur la membrane basilaire et il est séparé de la rampe vestibulaire par la membrane de Reissner. (adapté de *alamy.com*)

b. Organe de Corti

L'épithélium auditif appelé organe de Corti tient son nom de Alfonso Corti qui fut l'un des premiers anatomistes à en établir la description détaillée en 1851. Cet organe neurosensoriel est

à l'origine de la transformation du message mécanique induit par l'onde sonore en un signal électrique interprétable par le SNC.

- **Développement embryonnaire**

Entre E8 et E8,5 chez la souris, l'épaississement du feuillet ectodermique va rapidement former l'otocyste qui est à l'origine de la future oreille interne (Driver and Kelley, 2009; Morsli et al., 1998). La cochlée prend son origine dans la partie ventrale de l'otocyste. A E12,5, le canal cochléaire se forme et continue de s'allonger jusqu'à la fin de l'embryogénèse afin d'atteindre sa longueur définitive à la naissance (Jones et al., 2008). A ce stade de développement, l'expression de certains gènes, tels que Sox, vont permettre de définir le domaine prosensoriel à l'origine du futur épithélium cochléaire. A maturité cet épithélium est composé de cellules de soutien (CS) essentielles pour l'architecture de l'épithélium, des CC qui sont les principales actrices de la fonction auditive et des cellules neuronales essentielles à la conduction de l'information jusqu'au SNC. L'architecture complexe de l'organe de Corti participe à son efficacité et sa spécificité fonctionnelle indispensable à la fonction auditive.

Différenciation du domaine prosensoriel

Avant E12,5 les cellules qui composent l'épithélium auditif sont identiques. Puis, progressivement, certaines d'entre elles vont exprimer des facteurs prosensoriels ce qui vont permettre de délimiter le domaine prosensoriel (Driver and Kelley, 2009; Morsli et al., 1998; Wu and Kelley, 2012). Entre E12 et E14, sous l'influence du facteur p27^{Kip1} qui s'étend de l'apex vers la base de la cochlée, les cellules du domaine prosensoriel sortent du cycle cellulaire pour devenir post-mitotique (Chen and Segil, 1999; Jones et al., 2008; Montcouquiol and Kelley, 2003; Wu and Kelley, 2012). Puis, entre E13 et E15, sous l'influence du facteur Atoh1, ces cellules post-mitotiques vont se différencier en CC (Kelley, 2006; Lanford et al., 2000). Au sein de l'épithélium cochléaire, la différenciation des CC se fait selon deux gradients :

- Longitudinal : les cellules vont se différencier d'abord à la base de la cochlée pour progressivement terminer leur différenciation à l'apex environ 2 à 3 jours plus tard ;
- Et Proximo-Distal ou Neural-Abneural: ce qui correspond à un gradient de différenciation des CC en position proximale vers les CC en position distale, ou des CC internes vers les CC externes (Jones et al., 2008; May-Simera and Kelley, 2012).

Le nombre de CC est déterminé très tôt au cours du développement entre les stades E13 et E15 chez la souris et à 10 semaines de gestation chez l'homme. De plus, chez les mammifères

les CC ne sont pas dotées de capacité de régénération contrairement à d'autres espèces comme les oiseaux ou le poisson zèbre (Atkinson et al., 2015). Nous conservons donc les mêmes CC tout au long de notre vie. Par conséquent, lorsqu'elles sont endommagées elles ne sont jamais remplacées.

Mécanisme d'Extension/Convergente (EC)

Tout comme lors de la fermeture du tube neural ou de la gastrulation, le processus d'EC est essentiel pour l'architecture de la cochlée au cours du développement. A E14, l'épithélium auditif est très épais et pseudo-stratifié avec l'ensemble de ces cellules qui atteignent, grâce à des projections, à la fois la surface apicale et basale de l'épithélium (*figure 15*). A ce stade, le canal cochléaire est deux fois moins long que sa taille définitive. A maturité, l'organe de Corti est composé de deux couches de cellules avec une couche de CC qui repose sur une couche de CS (Driver et al., 2017; Montcouquiol and Kelley, 2019). L'EC permet une réorganisation des cellules au sein du tissu en l'absence de prolifération (Jones et al., 2008; Montcouquiol and Kelley, 2019). Le début de l'EC se produit entre E14 et E16. Durant cette période, les cellules subissent une intercalation radiale permettant une diminution de moitié de l'épaisseur de l'épithélium passant alors d'une épaisseur d'environ dix à cinq cellules (*figure 15*). Simultanément, les cellules subissent une réduction de leur hauteur conduisant à un affinement de l'organe de Corti. Dans un deuxième temps, une intercalation orthogonale permet un allongement de l'organe de Corti en direction de l'apex de la cochlée. Enfin, entre E16 et la naissance, le nombre d'intercalations cellulaires diminue au profit d'une augmentation du volume cellulaire, ce qui aboutit au maintien de la largeur (axe proximo-distal) mais une augmentation de la longueur de l'organe de Corti (*figure 15*) (Montcouquiol et Kelley 2019 - Driver et al 2017).

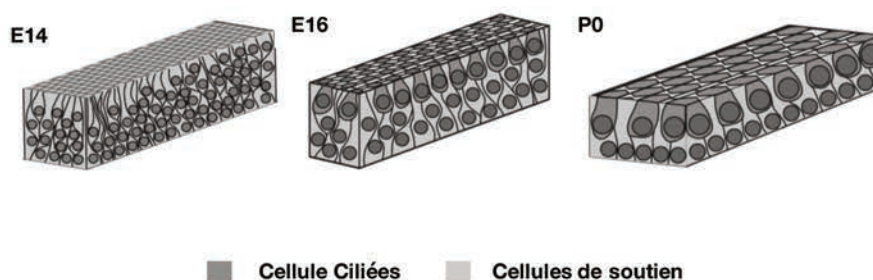


Figure 15 : Mécanisme d'extension convergente dans la cochlée. A E14, l'épithélium auditif est pseudo-stratifié avec plusieurs couches de cellules indifférenciées. A E16, une intercalation radiale et longitudinale permet de diminuer le nombre de couches de cellules, et les cellules commencent à se différencier. A la naissance, l'arrangement des cellules entre elles est définie avec une couche de cellules ciliées qui reposent sur une couche de cellules de soutien. (adapté de (Montcouquiol and Kelley, 2019))

Mise en place de l'axe de la PCP

Les CC tiennent leur nom du fait qu'elles sont coiffées à leur surface apicale d'une touffe ciliaire. Cette structure hautement polarisée est composée d'un ensemble de filaments riches en actine, appelés stéréocils. Il est important de noter que contrairement à leur nom, les stéréocils ne sont pas de vrais cils car ils sont uniquement composés d'actine. L'unique vrai cil de la CC, exclusivement composé de tubuline, appelé kinocil, se trouve en position distale à la pointe du "V" que la touffe ciliaire définit. La position du kinocil oriente la pointe de la touffe ciliaire et définit l'axe PCP de la CC. Dans cet organe, cette polarité est définie par l'orientation uniforme et concertée des touffes ciliaires dans une seule et même direction. La mise en place et le développement de la touffe ciliaire ont beaucoup été étudiés par le Dr Tilney en microscopie électronique à balayage sur la cochlée de poulet (Tilney et al., 1992). Depuis de nombreuses études ont décrit le développement et la mise en place de la touffe ciliaire chez la souris (Lu and Sipe, 2016). Chez la souris, à E13,5, le kinocil commence à se former en position centrale à la surface apicale des CC (*figure 16A*). Simultanément, de nombreuses microvillosités viennent entourer le kinocil et recouvrir la totalité de la surface apicale de la CC. De façon concomitante au processus d'EC, à E15,5, le kinocil va alors réaliser une migration translationnelle afin d'acquérir sa position finale au pôle distal de la CC (*figure 16B*). Les microvillosités adjacentes au kinocil vont commencer à s'allonger afin de former les futurs stéréocils (Lu and Sipe, 2016) (*figure 16B*). Les stéréocils vont alors temporairement arrêter de s'allonger afin de s'épaissir en passant d'environ 100 à 900 filaments d'actine par stéréocils. Pendant cette période, les stéréocils commencent à s'enchâsser dans un réseau dense en actine à la surface apicale de la CC : la plaque cuticulaire. Enfin, ils reprennent leur croissance jusqu'à atteindre leur taille définitive. Parallèlement à cette élongation, une résorption des stéréocils surnuméraires est mise en place afin d'aboutir à une touffe ciliaire formée de 3 à 4 rangées de taille croissante (Frolenkov et al., 2004; Jones et al., 2008) (*figure 16C*). A la naissance, la polarité des CC est terminée tout au long du canal cochléaire. Ce mécanisme nécessite principalement la distribution asymétrique des protéines centrales de la voie de la signalisation de la PCP ainsi que les protéines de la voie de la PCP dépendante des protéines Gi (voir Chapitre I : La polarité cellulaire).

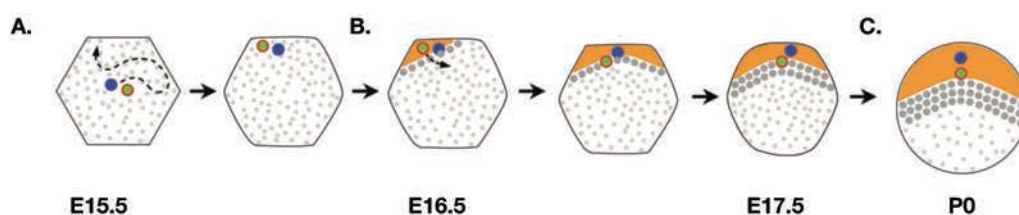


Figure 16 : Représentation schématique du développement de la touffe ciliaire chez la souris. **(A)** A E15,5, la surface apicale de la CC est recouverte de microvillosités (point gris clair). Le kinocil (bleu), accompagné de son centriole (vert), migre de sa position centrale vers le pôle distal de la CC ; **(B)** Les microvillosités adjacentes au kinocil commencent à s'épaissir pour donner les stéréocils (point gris foncé) ; **(C)** A la naissance, la surface apicale de la CC est composée d'une touffe ciliaire, d'un kinocil, et d'une zone dépourvue de microvillosités et de stéréocils située derrière le kinocil (zone orange). (adapté de (Lu and Sipe, 2016))

- **Développement, morphologie et fonction de la touffe ciliaire**

Organisation structurelle de la touffe ciliaire

A la naissance, la surface apicale de la CC est composée d'un kinocil en position distale et d'une touffe ciliaire en forme de « V » composée de 3 à 4 rangées de stéréocils de taille croissante avec les stéréocils les plus courts qui sont situés en position proximale et les stéréocils les plus longs en position distale, accolés au kinocil. Les stéréocils sont enchâssés et maintenus dans la plaque cuticulaire riche en actine. Un stéréocil est une structure polarisée avec sa partie basale, appelée "pointed" ou extrémité négative, et son sommet appelé "barbed" ou extrémité positive (Fettiplace and Kim, 2014; Tilney et al., 1980). Cette structure est composée d'un ensemble de filaments d'actine (actine filamenteuse ou actine-F) parallèles et rigidifiés grâce à des protéines liées à l'actine (actin cross-linked). L'absence de l'une de ces protéines conduit à la dégénérescence précoce de la touffe ciliaire, en lien avec des surdités chez l'homme (Diaz-Horta et al., 2018; Ebrahim et al., 2016; Scheffer et al., 2015; Sekerková et al., 2011; Shin et al., 2010; Taylor et al., 2015; Usui et al., 1999; Zhao et al., 2016).

L'ensemble de ces stéréocils sont liés entre eux grâce à cinq catégories de ponts protéiques afin de maintenir une cohésion de la touffe ciliaire. Ces différents liens protéiques sont appelés (figure 17) (Nayak et al., 2007) :

- Les liens apicaux (tip-links) qui relient le sommet d'un stéréocil à la membrane latérale du stéréocil voisin ;

- Les liens du sommet (top-links) qui relient le sommet d'un stéréocil à la membrane latérale du stéréocil voisin ;
- Les liens latéraux (shaft-links) qui relient les membranes latérales de deux stéréocils voisins ;
- Les liens à la base (ankle-links) qui relient la base de deux stéréocils ;
- Les liens au kinocil.

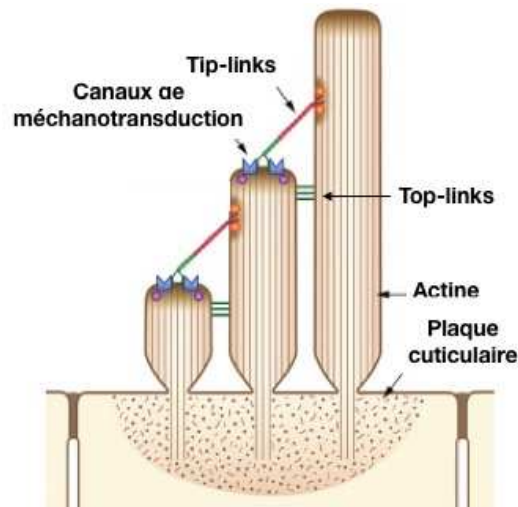


Figure 17 : Représentation schématique d'une coupe transversale d'une touffe ciliaire. Les stéréocils, organisés en rangées de taille croissante, sont reliés entre eux par des tip links. Au sommet des stéréocils, on retrouve les canaux de méchanotransduction essentiels à la fonction auditive. Afin de rigidifier la structure, les stéréocils sont enchâssés dans la plaque cuticulaire. (adapté de (Fettiplace, 2016))

Seuls les tip-links et les top-links sont conservés à l'âge l'adulte, les autres liens sont transitoires et dégénèrent à P12. Les tip-links sont essentiels à la fonction auditive et à la méchanotranduction. Toute rupture de ces liens aboutira à une désorganisation de la touffe ciliaire, souvent suivie d'une dégénérescence responsable de surdités chez la souris mais aussi chez l'homme.

La méchanotransduction

La méchanotransduction est un mécanisme qui correspond à la conversion de l'onde mécanique du son en un message électrique interprétable par le cerveau. Ce processus dépend de la présence de canaux de méchanotransduction au sommet des stéréocils de moyennes (rangée 2) et petites tailles (rangée 3). Lors d'une stimulation sonore, l'onde mécanique du son se propage le long du canal cochléaire permettant une vibration de la membrane basilaire sur laquelle repose l'organe de Corti. Suite à ce mouvement, la déflexion des stéréocils (de l'ordre du

nm) vers le kinocil engendre une tension des tip links et une ouverture des canaux de mécanotransduction perméables aux petits cations (K^+ et le Ca^{2+}). L'entrée de ces ions va permettre la dépolarisation de la CC qui va alors libérer des neurotransmetteurs à sa base. Ce relargage permet l'activation des neurones afférents conduisant à l'envoi de l'influx nerveux au SNC. On comprend alors que pour qu'un tel mécanisme puisse être possible, la conservation de la longueur, de l'organisation et de la cohésion des stéréocils au sein de la CC est essentielle.

Tip-complex, élongation et maintien de la longueur des stéréocils

Chez la souris, la touffe ciliaire est immature à la naissance. A ce stade, les stéréocils sont émergents et vont continuer à s'allonger durant les deux premières semaines post-natales (Frolenkov et al., 2004). C'est ainsi que, contrairement à l'homme, la souris ne commence à entendre que deux semaines après la naissance. Cette élongation est permise grâce à l'addition de monomères d'actine (polymérisation d'actine) au sommet des stéréocils (Rzadzinska et al., 2004a). Ce mécanisme nécessite la présence de protéines modulant les propriétés dynamiques de l'actine. Ces protéines sont accumulées au sommet des stéréocils et forment un complexe apical, ou « tip-complex » en anglais, au-dessus des filaments d'actine-F dans une zone riche en monomère d'actine (actine glomérulaire : actine-G). De nombreuses protéines sont connues pour être impliquées dans ce mécanisme. Parmi ces protéines, le complexe protéique Myosine 15 (Myo15), composé de la Myo15, Whirlin et Eps8 (Epidermal growth factor receptor Pathway Substrate 8) est indispensable à cette fonction.

La Myo15, accumulée au sommet des stéréocils, semble être la protéine centrale et essentielle à l'élongation des stéréocils. Elle est composée d'un domaine moteur, deux domaines Calmodulin binding motif (IQ), deux domaines MYosin Tail Homology 4 (MyTh4), deux domaines FERM, un domaine SH3 et un domaine PDZBD (*figure 18*). Grâce à son domaine moteur elle transporte au sommet des stéréocils des protéines modulant le cytosquelette d'actine. Une mutation de ce domaine, présente chez les souris *Shaker-2*, engendre des stéréocils anormalement courts et une perte de l'organisation en taille croissante des stéréocils ce qui est directement lié à des surdités autosomales récessives et des défauts vestibulaires chez cette souris. Cette mutation existe également chez l'homme et entraîne les mêmes symptômes (DFNB3 ; OMIM : 602666) (Belyantseva et al., 2003, 2005; Beyer et al., 2000; Delprat et al., 2005; Probst et al., 1998). Cette protéine a la capacité de se lier directement à Eps8 grâce à son domaine N-terminal et à la Whirlin avec son domaine C-terminal. A l'inverse, l'absence de la MyoIIIa et de la MyoIIIb, également présentes au sommet des stéréocils, va conduire à des

stéréocils anormalement longs et entraîner des surdités lorsqu'elles sont simultanément absentes de leur sommet (Lelli et al., 2016).

La Whirlin est tout aussi essentielle à l'élongation des stéréocils. Cette protéine d'échafaudage est le lien indispensable entre la Myo15 et les protéines qui doivent être transportées au sommet des stéréocils. Elle est composée d'un domaine Harmonin-N Like (HNL), de trois domaines PDZ lui permettant de nombreuses interactions protéiques et d'un domaine riche en proline (PR) (*figure 18*). La Whirlin est connue pour interagir avec le domaine C-terminal de Eps8 au niveau de ses domaines PDZ1/2 et du domaine riche en proline (Manor et al., 2011a). Elle interagit aussi avec les domaines MyTh4 et FERM de la Myo15 au moyen de ses domaines PDZ1/2 ainsi qu'avec le domaine PDZBD de la Myo15 au moyen de son domaine PDZ3 (Delprat et al., 2005; Manor et al., 2011a). L'absence de cette protéine (mutant murin *Whirler*) conduit à un phénotype identique à celui causé lors la mutation de la *Myo15*. Cette mutation entraîne donc des surdités autosomales récessives chez l'homme (DFNB31 ; OMIM 607084) (Alazami et al., 2015; Holme et al., 2002; Kikkawa et al., 2005; Mburu et al., 2003; Mogensen et al., 2007; Mustapha et al., 2007). La mutation de ce gène est aussi connue pour être à l'origine de rétinite pigmentaire associée à une surdité modérée chez les patients porteurs du syndrome de Usher de sous-type 2D (USH2D ; OMIM 611383) (Ebermann et al., 2007; Mathur and Yang, 2019) .

L'Eps8, est une « capping et bundling » protéine accumulée au sommet des stéréocils et est composée d'un domaine Phosphotyrosine binding domain (PTB), d'un domaine PR, d'un domaine SH3, d'un domaine capping et d'un domaine bundling (*figure 18*). Sa fonction de « capping » a pour but d'encapsuler l'extrémité positive (barbed end) des filaments d'actine composant les stéréocils et ainsi de réduire l'accessibilité aux facteurs nécessaires à l'élongation de cette structure. De façon contre intuitive, la mutation de ce gène chez la souris (souris *Eps8 cKO*) engendre non pas des stéréocils plus long mais des stéréocils anormalement courts tout comme l'absence de la Whirlin et de la Myo15 (Zampini et al., 2011). Grâce à sa fonction de bundling, Eps8 favorise le regroupement des filaments d'actine afin de former des faisceaux d'actine (bundles) (Higgs, 2004). Ceux-ci permettent la stabilisation du stéréocil, condition nécessaire à son allongement.

Une autre protéine de la famille des capping protéines, appelée Eps8L2 (Epidermal growth factor receptor Pathway Substrate 8 Like 2), uniquement exprimée au sommet des stéréocils des moyennes et petites rangées est essentielle pour l'élongation de cette structure. L'absence de cette protéine engendre des stéréocils plus courts dans la rangée la plus longue, où elle n'est pas

exprimée, ainsi qu'une dégénérescence progressive des stéréocils. Ce phénotype entraîne des surdités chez l'homme (Dahmani et al., 2015). Le Dr Furness conclut donc que Eps8 est essentielle pour l'élongation initiale des stéréocils alors que Eps8L2 est nécessaire à long terme pour le maintien de la longueur des stéréocils (Furness et al., 2013).

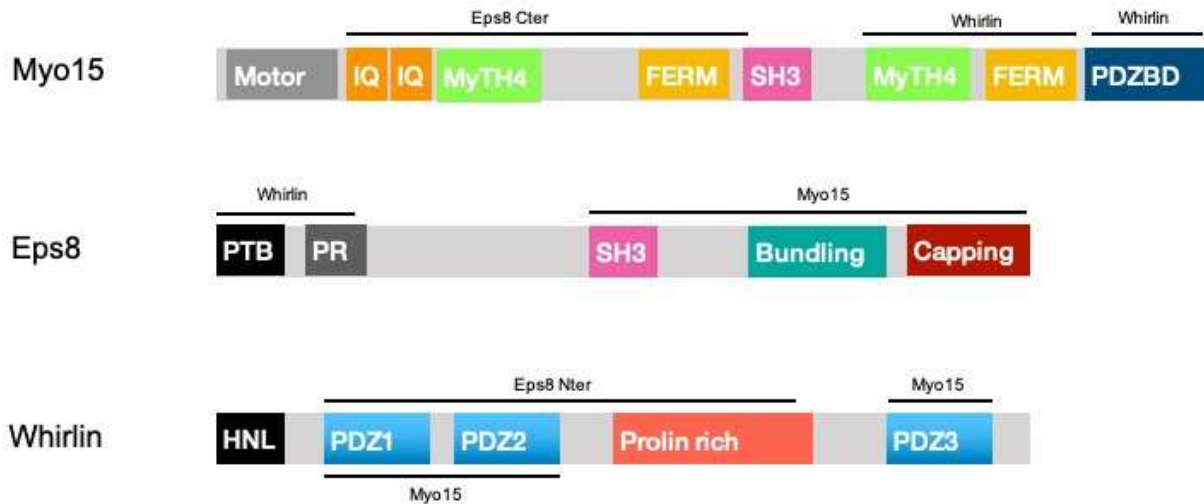


Figure 18 : Représentation schématique des protéines du complexe Myo15. (adapté de (Manor et al., 2011b))

La Twinfilin2 est elle aussi une capping protéine exprimée dans les moyennes et petites rangées de stéréocils. Il semble que cette protéine est en lien avec l'arrêt de la croissance de ces stéréocils permettant la mise en place du gradient de taille. En effet, son expression dans le temps est corrélée avec l'arrêt de l'élongation de ces stéréocils. De façon intéressante, le Dr Rzadzinska observe dans un premier temps que la mutation de *MyoVIIa* (mutant *Shaker-1*), présent dans les moyennes et petites rangées de stéréocils, conduit à une touffe ciliaire fragmentée avec des stéréocils de la rangée la plus grande anormalement longs. Dans un second temps, il met en évidence une interaction entre la *MyoVIIa* et la Twinfilin, et en concluent que ce phénotype observé chez les mutants *shaker-1* est induit par une perte de l'effet inhibiteur de la Twinfilin en absence de l'effet stabilisateur de la *MyoVIIa* (Rzadzinska et al., 2009). A partir de ces observations, une hypothèse a été formulée selon laquelle l'organisation en taille croissante des stéréocils au sein de la touffe ciliaire serait possible grâce à deux catégories de protéines, les protéines Myo15 et Whirlin, qui permettent une élongation des stéréocils les plus longs, et les protéines MyoVIIa et Twinfilin2, qui ont une activité inhibitrice sur l'élongation des stéréocils plus courts (Rzadzinska et al., 2009).

Les protéines formant le tip-complex ou liant les filaments d'actine entre eux jouent aussi un rôle dans la régulation de l'épaisseur des stéréocils. En règle générale, la mutation des gènes codant pour les protéines liant les filaments d'actine entre eux conduit à des stéréocils plus fins responsables d'une dégénérescence précoce de la touffe ciliaire. A l'inverse, l'absence de certaines protéines essentielles à l'élongation des stéréocils, telles que Myo15 (mutant *Shaker-2*), Whirlin (mutant *Whirler*), ou Eps8, sont connues pour induire des stéréocils plus larges. Si on prend l'exemple de la Whirlin, l'absence de cette protéine entraîne des stéréocils anormalement épais. Contrairement à ce qu'on pourrait penser cet élargissement n'est pas causé par une augmentation du nombre de filaments d'actine au sein des stéréocils mais à une augmentation du nombre de protéines liant les filaments d'actine entre eux ce qui augmente l'espace entre ces filaments (Mogensen et al., 2007). En 2011, le Dr Wang démontre *in vitro* une interaction entre la Whirlin et Espin, une protéine liant les filaments d'actines entre eux (Wang et al., 2012a). De plus, à l'inverse de l'absence de la Whirlin, l'absence de Espin (mutant *Jeker*), est connue pour conduire à des stéréocils anormalement fins (Rzadzinska et al., 2005; Sekerková et al., 2011). Ces études mettent donc en avant toute l'importance de l'équilibre d'expression de la protéine Espin, modulé négativement par la Whirlin, sur le diamètre des stéréocils. La MyoVI joue également un rôle essentiel dans l'architecture des stéréocils. En effet, cette protéine localisée à la base des stéréocils conduit à une fusion des stéréocils, à une déformation de la plaque cuticulaire et à une perte de l'affinement de la base du stéréocil, conduisant à des surdités chez l'homme (Self et al., 1999).

Sachant que les CC des mammifères n'ont pas de capacité de régénérescence, l'homéostasie des stéréocils avec un maintien et une régulation précise de la longueur de cette structure est cruciale pour la fonction auditive. Les mécanismes intervenant dans cette fonction sont encore méconnus et sujets à controverse. En effet, une des hypothèses émises est schématiquement décrite comme un processus de tapis roulant (treadmill) avec un renouvellement continu de la totalité de la longueur du filament d'actine. Ce renouvellement continu est rendu possible grâce à une polymérisation de l'actine au sommet par ajout de monomère d'actine (actine-G) et une dépolymérisation simultanée d'actine à la base de celui-ci (Rzadzinska et al., 2004b; Schneider et al., 2002). Pour étayer leur hypothèse, ils ont analysé l'incorporation de molécules d'actines exogènes liées à un fluorophore au cours du temps sur des CC en culture. Ils ont ainsi observé qu'un renouvellement rapide et total du filament d'actine se fait en 24/48 heures dans l'organe de Corti et 72/96 heures dans le vestibule. Ils ont constaté que cette vitesse de renouvellement était dépendante de la longueur des stéréocils et est par conséquent plus importante dans les stéréocils les plus longs. Depuis, un nouveau modèle de

renouvellement lent et restreint au sommet des filaments d'actine-F (slow treadmill mode) s'oppose au modèle de renouvellement rapide (rapid treadmill model) précédemment établi. En effet, grâce à une technique d'imagerie de cellules vivantes « Live cells imaging », en 2015, deux équipes ont démontré que ce renouvellement du filament d'actine se fait seulement sur une portion restreinte au sommet des filaments d'actine des stéréocils. Pour cela, ils ont également utilisé des CC en culture transfectées par gene-gun avec de l'actine liée à un fluorophore. Ils ont confirmé ces résultats en observant l'incorporation de monomères d'actine liés à une molécule photoconvertible ou alors en observant l'incorporation d'isotopes d'azote stable (N^{15}) nécessaires à la synthèse protéique (Drummond et al., 2015; Narayanan et al., 2015).

- **Caractéristiques morpho-fonctionnelles des CC et des CS**

Le parfait alignement et arrangement des CC et CS entre elles est indispensable à la fonction auditive. Par conséquent toute perturbation dans la disposition de ces cellules engendrera des conséquences irréversibles sur l'audition. Chaque CC est séparée d'une autre CC par des CS. Les CC sont des cellules neuro-sensorielles. Concrètement, ces cellules possèdent à la fois les caractéristiques d'une cellule épithéliale, avec une polarité A-B, mais également les propriétés d'une cellule neuronale, grâce aux innervations afférentes et efférentes qu'elles possèdent et au fait qu'elles libèrent des neurotransmetteurs à leur base. Les CC sont de réels capteurs sensoriels essentiels à la fonction auditive. Elles sont chargées de convertir un signal mécanique induit par une onde sonore en un message électrique interprétable par le cerveau. Il existe deux types de cellules ciliées : les CC internes (CCI) et les CC externes (CCE). Plus précisément, l'organe de Corti est organisé de sa partie proximale vers sa partie distale par une rangée de CCI puis trois rangées de CCE, le tout séparé par des CS. Ces deux types cellulaires diffèrent par leurs formes et leurs fonctions (*figure 19*).

Les Cellules Ciliées Internes (CCI)

Au niveau fonctionnel, les CCI sont de véritables cellules sensorielles qui sont au cœur de la perception auditive. Morphologiquement, les CCI présentent une forme de poire avec une touffe ciliaire en forme de « U » (*figure 19A et B1*). Les CCI (environ 3500 chez l'homme) reçoivent 90-95% des afférences des neurones auditifs de types I myélinisés qui font d'elles les principales actrices de la perception auditive (Delacroix and Malgrange, 2015; Rask-Andersen et al., 2012). Une des grandes particularités des CCI est qu'elles possèdent à leur base des synapses particulières appelées synapses à ruban. Contrairement à des synapses classiques, ces synapses ne nécessitent pas de seuil minimal de dépolarisation et elles ne possèdent pas de

période réfractaire. Ces caractéristiques font d'elles des synapses très rapides mais aussi inépuisable (avec 1400 vésicules qui peuvent fusionner à la membrane contre 7 à 20 pour une synapse classique) (Fuchs, 2005).

Les Cellules Ciliées Externes (CCE)

Contrairement aux CCI, la touffe ciliaire des CCE est en forme de "V" ou de "W" (*figure 19A et 19B2*). Au niveau fonctionnel, bien que trois fois plus nombreuses que les CCI, les CCE (1200 en moyenne chez l'homme) jouent un rôle mineur dans la perception auditive en recevant uniquement 5-10% des neurones afférents de type II non myélinisés (Berglund and Ryugo, 1987; Delacroix and Malgrange, 2015). La principale fonction des CCE est l'amplification locale de la vibration de la membrane basilaire induite par une stimulation sonore dans le but d'augmenter la sensibilité auditive (Fettiplace and Hackney, 2006). Cette modulation est possible grâce à la propriété contractile de la prestine le long de la membrane basolatérale de la CCE (Rask-Andersen et al., 2012). C'est grâce à des cycles de contraction-relâchement que les CCE peuvent moduler l'intensité de la stimulation sonore. Ce mécanisme est connu sous le nom d'électromotilité. Cette fonction contractile et d'amplification des CCE peut être enregistrées par la mesure des produits de distorsion des otoémissions acoustiques (DPOAE) (Rüttiger et al., 2017).

Les Cellules de soutien (CS)

Le rôle initialement identifié des CS est de séparer les CC les unes des autres, de les soutenir physiquement et ainsi de donner une structure rigide à l'organe de Corti. L'expression de certains gènes centraux de la PCP dans les SC suggère aussi un rôle important de ces cellules dans la mise en place de l'axe de la PCP. De plus, ces cellules sont connues pour agir sur la survie des neurones du ganglion spiral en relargant des facteurs neurotrophiques, tels que BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) ou NT-3 (Neurotrophin 3) (Delacroix and Malgrange, 2015; Montcouquiol et al., 1998; Monzack and Cunningham, 2013). L'arrangement parfait de ces cellules entre elles est terminé à la naissance. A maturité, on dénombre sept types de CS nommées de la partie proximale à la partie distale (*figure 19C*) (Driver and Kelley, 2009; Fritzsche and Elliott, 2018) :

- Cellules de la Bordure Interne (border cells) ;
- Cellules Phalangéales internes (inner phalangeal cells) et externes (outer phalangeal cells) qui séparent les CCI des CCE ;

- Cellules Piliers Internes (inner pillar cells) et Externes (outer pillar cells) qui forment en leur centre le Tunnel de Corti ;
- Cellules de Deiter (Deiters cells) qui soutiennent les CCE ;
- Et les Cellules de Hensen.

De part et d'autre, on retrouve l'inner sulcus (partie proximale/neurale) et l'outer Sulcus qui borde ce domaine (partie distale/abneural). Chez certaines espèces, tels que les poulets, outre leur rôle de soutien, les CS participent à la régénération de l'épithélium sensoriel (Warchol, 2007). Cette particularité absente chez les mammifères fait l'objet d'une recherche intensive afin de l'exploiter pour régénérer des CC chez l'homme.

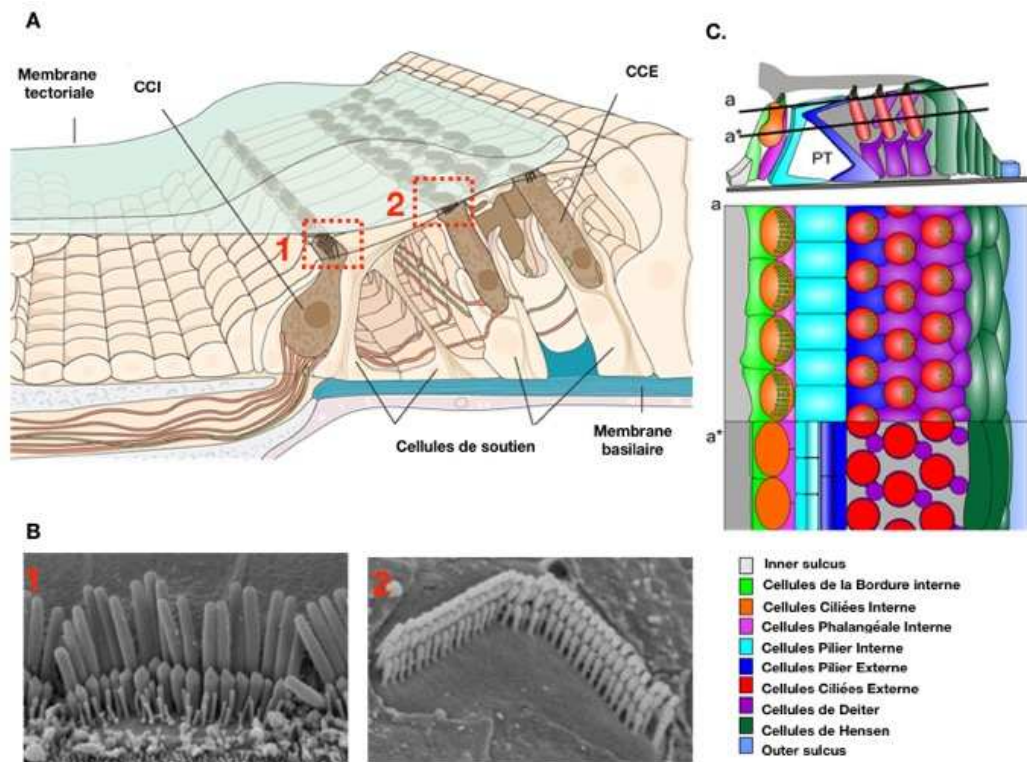


Figure 19 : Structure de l'organe de Corti. (A) Coupe transversale de l'organe de Corti. Les cellules ciliées internes (CCI) sont organisées en une seule rangée sur la partie proximale et les cellules ciliées externes (CCE) sont organisées en trois rangées sur la partie distale. (adapté de : *Principles of Neural science, 5th edition*) ; (B) Vue de surface d'une CCI (1) et d'une CCE (2) en microscopie électronique à balayage (images obtenues par le Dr Forge, UCL à Londres) ; (C) Représentation schématique de l'organisation des cellules de soutien (CS) au sein de l'organe de Corti. (adapté de : (*Fritzsch and Elliott, 2018*))

E. Caractéristiques d'un son

Un son est défini comme une vibration mécanique qui se propage sous forme d'onde sinusoïdale. Il est caractérisé par deux paramètres : une fréquence (en Hertz (Hz)) et une intensité (en Décibels (dB)).

1. Le spectre auditif

Chaque espèce possède un spectre auditif bien précis. L'homme peut entendre une gamme spécifique de fréquences comprises entre 20 (fréquences graves) et 20000Hz (fréquences aiguës). Basé sur ce spectre nous appelons infrasons les sons dont la fréquence est inférieure à 20Hz et ultrasons les sons supérieurs à 20000Hz. Pour exemple, les animaux tels que les taupes ou les éléphants sont capables d'entendre des infrasons et donc de capter des vibrations telles que celles émises avant un tremblement de terre. A l'inverse, les dauphins ou les chauves-souris peuvent entendre des ultrasons allant jusqu'à 160000Hz. (Raphael et al., 1991).

L'oreille perçoit des niveaux d'intensité de sons qui sont souvent décrits sous la forme d'une échelle avec différents niveaux de danger. Ainsi :

- Entre 0 et 80dB : les sons sont considérés comme sans risque pour l'audition. Par exemple une conversation normale entre deux personnes se situe à 60dB ;
- Entre 80 et 115dB : les sons sont considérés comme nocifs pour l'audition. C'est le cas pour le bruit produit par un marteau piqueur ;
- Entre 115 et plus de 140dB : les sons sont considérés comme très dangereux pour l'audition car ils entraînent des dommages irréversibles. C'est le cas du bruit d'un avion qui décolle.

Ces deux caractéristiques du son, fréquence et intensité, permettent de créer une courbe d'audibilité. Cette courbe indique pour chaque fréquence le seuil en dB nécessaire à la perception. Pour des fréquences de sons proches des extrémités du champ audible, nous avons besoin d'une intensité plus élevée que pour des fréquences de sons situées au milieu de la gamme.

2. La tonotopie de l'organe de Corti :

Une des caractéristiques remarquables de l'organe de Corti est que c'est un organe tonotopique. Concrètement, cela signifie qu'il y a une graduation continue de l'analyse des sons en fonction de leur fréquence le long de l'organe de Corti. Par conséquent les sons de hautes fréquences, correspondant à des sons aigus, sont encodés à la base de la cochlée tandis que les

sons de basses fréquences, correspondant à des sons graves, sont encodés à l'apex de la cochlée. Ce mécanisme fait intervenir les propriétés élastiques de la membrane basilaire sur laquelle repose l'organe de Corti. En effet, l'onde sonore va être amplifiée par le conduit auditif externe, puis elle va induire la vibration de la membrane tympanique qui va conduire à la vibration des osselets. L'étrier va propager cette force en faisant vibrer la périlymphe contenue dans la chambre vestibulaire. Ce mouvement liquidien va alors se propager par l'hélicotrema dans la chambre tympanique et induire la vibration de la membrane basilaire. La distance parcourue par l'onde sonore propagée le long de la membrane basilaire dépend de sa fréquence. En effet, la structure de la membrane basilaire diffère entre la base et l'apex de la cochlée. A la base, cette membrane est étroite mais plus épaisse ce qui fait d'elle une membrane rigide contrairement à l'apex où elle est large et fine et donc souple. Ainsi, lorsqu'un son de haute fréquence atteint l'oreille, il fait vibrer intensément la base de la membrane basilaire ce qui est très coûteux en énergie et ne permet pas ensuite la propagation du son vers l'apex de la cochlée. A l'inverse, les sons de basses fréquences sont dans l'incapacité de faire vibrer la base de la cochlée et vont donc garder leur énergie et se propager vers l'apex de la cochlée.

3. Les voies auditives

A la sortie de l'oreille interne, le ganglion spiral (en provenance de la cochlée) et le nerf vestibulaire se rejoignent pour former le nerf vestibulo-cochléaire qui est le VIIIème nerf crânien. Ce nerf contenant les informations auditives va alors rejoindre le cortex auditif en passant par plusieurs relais.

a. Le noyau cochléaire

Le noyau cochléaire est le premier relais auditif faisant suite aux CC, situé dans la partie latérale de la moelle épinière. A ce niveau, la fonction de cette structure est de décoder la durée, l'intensité, et la fréquence du son émis.

b. Le complexe olivaire supérieur

Les fibres nerveuses en provenance du noyau cochléaire vont projeter en ipsi et controlatéral au niveau du complexe olivaire supérieur. Une telle organisation permet à un hémisphère de recevoir les informations des deux oreilles à la fois et donc de percevoir un son unique. C'est aussi au niveau de cette structure que s'opère un rétrocontrôle négatif sur les CCE *via* la projection de fibres efférentes cholinergique. On retrouve aussi les synapses les plus grandes du système nerveux central : les calices de Held (Borst and Soria van Hoeve, 2012).

c. Le colliculus inférieur

Le colliculus inférieur, situé au niveau du mésencéphale, reçoit les fibres neuronales en provenance du complexe olivaire supérieur. Cette structure joue essentiellement un rôle dans le décodage de la localisation d'un son.

d. Corps genouillé médian

Le dernier relais avant le cortex est le corps genouillé médian situé au niveau du thalamus. C'est au niveau de cette structure que se fait un travail d'intégration en préparant une réponse motrice. L'ensemble des fibres de ce relais vont alors projeter sur le cortex auditif afin de terminer le décodage du son.

L'ensemble de ces relais ainsi que le cortex auditif primaire conservent l'organisation tonotopique de la cochlée afin de conserver les informations sur la fréquence du signal sonore. A l'aide d'un test appelé Potentiels Evoqués Auditifs (PEA ou ABR pour Auditory Brainstem Response en anglais), les potentiels du nerf en provenance des CCI sont enregistrés pour les différentes intensités du son. Ce type d'enregistrement est un audiogramme. Sur les traces de cet enregistrement on retrouve différents pics correspondants au différents relais des voies auditives. Il est également possible de mesurer la fonctionnalité des CCE grâce à la mesure des produits de distorsions des otoémissions acoustiques (DPOAE en anglais). Par conséquent, ces tests nous donnent la possibilité de déterminer l'origine d'une surdité (Rüttiger et al., 2017).

F. Surdités

La surdité est définie comme une altération de l'acuité auditive. Elle représente le déficit sensoriel le plus représenté dans le monde. En effet, d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), on estime que 466 millions de personnes dans le monde ont une déficience auditive

incapacitante (déficit supérieur à 40dB) dont 34 millions d'enfants. Si on prend l'exemple de la France, on observe près d'un millier de nouveau-nés (0,25%) qui naissent par an avec un déficit auditif. De plus, le nombre de personnes touchées par une surdité ne cesse de croître avec l'âge. L'INSERM (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale) estime que 6% des personnes entre 15 et 24 ans, 9% des personnes entre 25 et 34 ans, 18% des personnes entre 35 et 44 ans et plus de 65% des personnes de plus de 65 ans ont des déficits auditifs. Il est estimé que d'ici 2050, 900 millions de personnes seront touchées par une déficience auditive (soit près d'une personne sur 10). La perte auditive a des répercussions à différents niveaux, et en particulier au niveau :

- Social : avec un isolement des personnes touchées qui sont dans l'impossibilité de communiquer avec les autres. Cet isolement peut avoir des préjudices non négligeables sur la vie quotidienne,
- Economique : avec un coût au niveau du secteur de la santé.

Toutes ces données permettent d'affirmer que la surdité est un problème majeur de santé publique.

Il existe différents niveaux de surdité évalués par audiogramme :

- Légère : perte auditive comprise entre 20 et 40 dB ;
- Moyenne : perte auditive comprise entre 40 et 70 dB ;
- Sévère : perte auditive comprise entre de 70 à 90 dB ;
- Profonde : perte auditive comprise entre 90 et 120dB.

Une surdité peut avoir différentes origines ce qui permet de la classer selon quatre catégories :

- Surdité de transmission (très facilement traitée) : qui correspond souvent à une atteinte de l'oreille externe ou moyenne (otites chroniques, malformation de la chaîne des osselets...);
- Surdité de perception (majorité des surdités) : qui correspond à une atteinte de la portion auditive de l'oreille interne ou des voies nerveuses auditives (surdité congénitale, traumatisme crânien, infection, médicaments ototoxiques...);
- Surdité mixte : qui correspond à une surdité de transmission et de perception ;
- Surdité brusque (très rare) qui apparaît souvent sans cause bien définie (souvent causée par une infection, un traumatisme crânien...).

Les causes de déficits auditifs peuvent être classées en deux catégories. Elles peuvent être :

- Congénitales : déficit présent dès la naissance ou acquis très tôt après la naissance ;
- Ou Acquis : déficit apparaissant à tout âge.

Les surdités congénitales peuvent être d'origine génétique, récessive ou dominante, ou bien engendrées suite à des complications pendant la grossesse ou lors de l'accouchement (maladie développée pendant la grossesse, asphyxie à la naissance, jaunisse...). Parmi ces surdités on peut subdiviser en surdité syndromique (associée à d'autres anomalies) ou non syndromique (non associée à d'autres troubles). A l'inverse, les surdités acquises sont souvent liées à des facteurs environnementaux (traumatisme crânien, exposition à un niveau sonore excessif) ou à des traumatismes récurrents (maladies infectieuses, médicaments ototoxiques...).

Chapitre III : Le système nerveux central

A. Définitions et généralités

Au cours de cet exposé je vais me focaliser sur la compréhension de la mise en place du cortex au cours du développement. A E14,5, le cortex est composé de différentes zones inégales en taille et en composition, qui sont de la partie apicale vers la partie basale : la zone ventriculaire (ou ventricular zone (VZ)), la zone subventriculaire (ou subventricular zone (SVZ)), la zone intermédiaire (ou intermediate zone (IZ)), la sous plaque (ou subplate (SP)), la plaque corticale (ou cortical plate (CP)), et la zone marginale (ou marginal zone (MZ)) (Fame et al., 2011; Kwan et al., 2012) (*figure 20*). Le moment de production des neurones qui composent la CP au cours de la neurogénèse va définir leur devenir, leur fonction ainsi que leur position au sein des couches corticales. Dans sa globalité, le cortex à maturité est composé de deux catégories de neurones : 80% de neurones glutamatergiques (excitateurs) et 20% de neurones GABAergiques (inhibiteurs). La répartition de ces neurones au sein du cortex se fait selon deux modes de migration : radiale (neurones glutamatergiques) et tangentielle (neurones GABAergiques).

B. Développement et migration neuronale

1. Migration radiale pour les neurones excitateurs du cortex

Chez la souris entre E14 et E16, les neurones corticaux excitateurs prennent naissance au niveau de la VZ située au niveau du télencéphale dorsal (*figure 20*) (Paridaen and Huttner, 2014b). Initialement, la plaque neurale est formée d'une seule couche de progéniteurs neuroépithéliales (NE) qui vont former le neuroépithélium au niveau de la VZ. Ces cellules sont polarisées avec leur pôle apical attaché à la surface ventriculaire et leur pôle basal en contact avec la surface du futur cerveau appelée surface piaie. Les cellules NE ont un petit domaine apical séparé du volumineux domaine basal par des TJ afin de limiter la diffusion des molécules apicales vers le domaine basal. Cet épithélium est pseudostratifié avec les noyaux des cellules NE réparties sur toute l'épaisseur du cortex. Ces noyaux vont alors migrer le long de l'axe apico-basal en fonction des stades du cycle cellulaire avec systématiquement une division mitotique au niveau de la VZ. Au cours du développement, la première phase mise en place est la phase pré-neurogénèse, qui consiste en une phase de prolifération massive avec des divisions symétrique des cellules NE pour permettre un renouvellement des progéniteurs (McConnell, 1995; Rakic, 1995). Puis, une phase de neurogénèse se met en place. La division des cellules NE devient alors asymétrique permettant la génération de deux cellules aux fonctions différentes : un neurone et une cellule progénitrice capable de se diviser à nouveau (Götz and Huttner, 2005). Les premiers neurones générés vont

migrer pour former la SP. Les cellules NE vont ensuite se transformer en cellules de la glie radiaire apicale (ou apical Radial Glia Cell (aRGC)) afin de servir de support pour la migration des neurones vers la surface piaie. Les cellules NE et les aRGC définissent alors des cellules progénitrices apicales. Au cours de leur migration le long des aRGC, les neurones sont dans un premier temps multipolaire dans la IZ puis ils acquièrent une forme bipolaire dans la CP avant de trouver leur position définitive. Chez les mammifères les aRGC vont donner naissance à une catégorie de cellules progénitrices basales : les progéniteurs intermédiaire (ou Intermediate Progenitor Cell (IPC)) et les bRGC basales (ou basal Radial Glia Cell (bRGC)) (Fietz and Huttner, 2011; Kriegstein and Noctor, 2004; Peyre and Morin, 2012; Wang et al., 2011). Ces progéniteurs sont différents au niveau de leur morphologie et de leur composition protéique. Chez tous les mammifères, les IPC sont des cellules apolaires qui vont migrer en position basale vers la SVZ tout en rétractant leur attachement apical et leur processus basal. Puis, elles vont acquérir une division symétrique afin de donner naissance à deux neurones qui vont migrer le long de la RGC pour acquérir leur position au niveau de la CP. Uniquement chez les gyrencéphales (mammifères présentant des circonvolutions du cortex), on retrouve les bRGC, des cellules unipolaires qui vont migrer en position basale vers la SVZ, tout en perdant leur lien apical et en conservant leur processus basal. Ces cellules vont alors avoir le choix entre une division symétrique, pour renouveler le stock de bRGC au niveau de la SVZ, ou alors une division asymétrique afin de produire de nouveaux neurones qui vont migrer dans les couches de la CP (*figure 20*). Ces bRGC ont été décrites comme étant essentielles pour la formation des repliements (circonvolution) à la surface du cerveau (Fietz and Huttner, 2011).

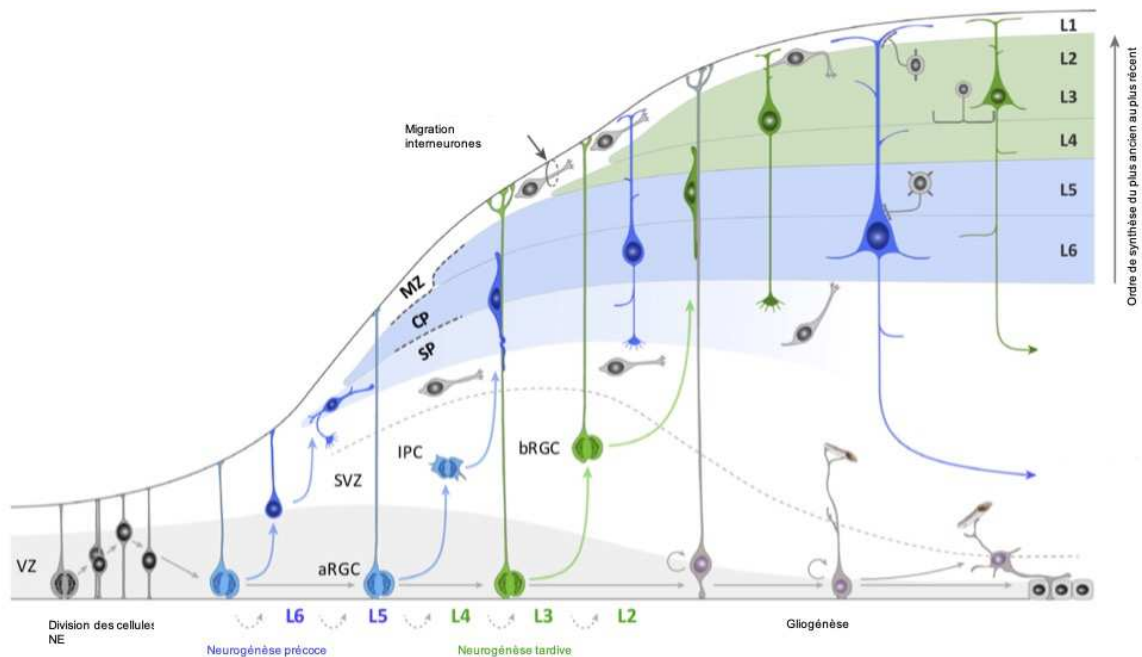


Figure 20 : Représentation schématique de la génération, migration et différenciation des cellules neuronales du cortex. En pré-neurogénése, les cellules neuroépithéliales (NE) situées dans la zone ventriculaire (VZ) subissent une division symétrique pour produire un stock de cellules progénitrices. Les premiers neurones générés vont former la sous plaque (SP). Puis, pendant la neurogénése précoce, les cellules NE vont alors se transformer en cellules de la glie radiale apicales (aRGC). Les aRGC acquièrent une division asymétrique afin de générer une nouvelle aRGC et un neurone. Ce neurone alors généré va se lier à la projection basale de aRGC et migrer dans la plaque corticale (CP) pour acquérir sa position définitive. Les neurones nés en premier vont former les couches profondes de la CP (couches 5 et 6 (L5-L6)) alors que les neurones générés plus tardivement vont former les couches superficielles de la CP (couches 2, 3 et 4 (L2, L3 et L4)). Certaines populations de aRGC vont donner naissance à des progéniteurs intermédiaire (IPC) ou des progéniteurs basaux RGC (bRGC) dans la zone subventriculaire (SVZ). A la fin de la neurogénése, les aRGC vont retracer leur processus basal pour générer des cellules gliales ou des cellules épendymaires. Lors de la migration tangentielle, les interneurons vont migrer au niveau de la zone marginale (MZ ou L1) et de la zone intermédiaire (IZ). Les neurones des différentes couches corticales vont alors projeter leurs axones soit en dehors du cerveau (tronc cérébral, moelle épinière...) pour les couches profondes ou alors au sein du cerveau pour les couches superficielles. (adapté de (Kwan et al., 2012; Shibata et al., 2015))

Au cours de la neurogénése, les différentes projections neuronales vont séquentiellement être générées et migrer dans les différentes couches du cortex. Les neurones qui vont donner les couches les plus profondes sont générés en premier, suivis des neurones qui vont former les couches superficielles. A maturité, le cortex est composé de six couches allant de la couche 1, la plus externe, à la couche 6, la plus interne (Fame et al., 2011; Kwan et al., 2012). C'est donc le moment de synthèse des neurones qui est déterminant pour leur position et leurs fonctions. Chaque couche corticale aura donc une identité cellulaire reflétée par l'expression de facteurs de transcription bien spécifiques. Les plus caractérisés et utilisés pour le marquage de ces différentes couches en immunohistologie sont :

- Couche 1 : Reelin, Calretinin et Tbr1 ;
- Couche 2/3 : Cux1 et Brn1/2 ;
- Couche 2/3/4 : Satb2 ;
- Couche 5 : Ctip2 ou Sox5 ;
- Couche 6 : Tbr1 ;
- Couche SVZ : Tbr2 et Btg2 ;
- Couche VZ : Pax6 et Sox2.

Les fonctions et futures connexions des neurones sont déterminées par la couche dans laquelle ils se situent. Par exemple, les neurones des couches 6, 5 et 4 projettent sur le thalamus et forment les conduits corticaux/thalamique alors que les neurones des couches 2 et 3 forment la majorité (80%) du corps calleux en projetant leurs axones de façon contralatérale pour connecter l'hémisphère opposé (Fame et al., 2011; Kwan et al., 2012).

A la fin de la neurogénèse, la gliogénèse se met en place grâce à une transformation des aRGC en cellules gliales (astrocytes) ou en cellules épendymaires. Ces cellules nerveuses composent l'environnement des neurones. Elles assurent entre autre l'homéostasie, la protection, et l'élimination des cellules mortes tout en combattant les pathogènes.

2. Migration tangentielle et radiale pour les neurones inhibiteurs du cortex

A partir de E13,5, chez les rongeurs, les neurones GABAergiques corticaux sont générés au niveau de la zone ventriculaire ventrale dans deux structures : les éminences ganglionnaires médiales et latérales (ou medial ganglionic eminence (MGE) et lateral ganglionic eminence (LGE)) (Klingler, 2017; Marín and Rubenstein, 2001). A l'inverse des neurones excitateurs du cortex, les neurones inhibiteurs débutent leur migration de façon tangentielle jusqu'à la MG et l'IZ du cortex puis ils basculent sur une migration radiale afin de coloniser les différentes couches du cortex (Buchsbaum and Cappello, 2019a; Marín et al., 2010).

C. Les gènes de polarité dans le développement du Système nerveux central (SNC)

Le cerveau est un organe complexe composé de milliards de neurones connectés entre eux grâce à leurs synapses. La polarité correcte des neurones est donc essentielle au bon fonctionnement synaptique. Pour ce faire, les neurones sont des cellules polarisées avec un corps cellulaire, un axone et un arbre dendritique. Les neurones reçoivent l'information en provenance de l'environnement grâce à leurs dendrites, cette information transite le long de l'axone jusqu'aux terminaisons synaptique afin de transmettre l'information aux cellules voisines qu'elles contactent.

La polarité et la motilité neuronales dépendent essentiellement de l'organisation et de la dynamique du cytosquelette. Les gènes de la PCP, tous exprimés au niveau cérébral, jouent un rôle essentiel dans le développement neuronal comme par exemple lors du développement dendritique, de la migration neuronale ou du guidage axonal. Par conséquent, toute perturbation de ces gènes aura une conséquence directe sur la morphologie neuronale (Tissir and Goffinet, 2006).

Si nous prenons l'exemple de la drosophile, *Fmi* est décrite comme étant importante pour le développement des fibres axonales du système visuel. L'œil de drosophile est composé de plus de 750 ommatidies (photorécepteurs), et chaque ommatidie est composée de 8 neurones photorécepteurs (R1-R8). Ces neurones photorécepteurs peuvent être subdivisés en deux groupes, R1-R6 et R7-R8 basé sur le fait qu'ils projettent différemment au niveau du SNC (Lee et al., 2003; Senti et al., 2003). Dans ce modèle, *Fmi* a été décrit comme étant enrichie dans le cône de croissance. Au cours du développement, l'extrémité distale des jeunes neurones est composée d'une structure riche en actine appelée le cône de croissance. Cette structure motile capte les informations attractives ou répulsives contenues dans le milieu extracellulaire afin de s'orienter et d'atteindre sa destination finale. Par conséquent, l'absence de *Fmi* dans cette structure conduit à une perturbation du guidage axonal matérialisée par une désorganisation de la projection des neurones au niveau du SNC (Lee et al., 2003; Senti et al., 2003).

Chez les mammifères, contrairement aux cellules épithéliales, la mutation des gènes centraux de la PCP ne semble pas toujours engendrer les mêmes phénotypes. Par exemple, en 2004 le Dr Shima découvre que l'absence de *Celsr2* conduit à une diminution de la longueur dendritique mais aussi à une diminution de la complexité de l'arbre dendritique alors que *Celsr3* semble avoir l'effet opposé (Shima et al., 2004). La mutation de *Pk2* a aussi été décrite comme perturbant le développement synaptique au niveau de l'hippocampe chez la souris. Ce phénotype est directement en lien avec des symptômes du spectre autistique (Sowers et al., 2013).

Les voies de signalisation des protéines centrales de la PCP sont aussi connues pour être essentielles à la migration neuronale au cours du développement, comme par exemple lors de la migration des neurones branchiomoteurs du visage (Facial branchiomotor (FBM)). La migration de ces neurones combine à la fois une migration tangentielle et radiale. Initialement générés au niveau du 4ème rhombomère (ou cerveau dorsal – r4) à E9,5 chez la souris, les corps cellulaires des neurones FBM vont dans un premier temps migrer tangentiellement et caudalement vers le 6ème rhombomère (r6) avant de migrer de façon radiale en position dorsale dans le r6 afin de

connecter les muscles du visage (Tissir and Goffinet, 2013). Les premières évidences de l'implication des gènes de la PCP dans ce mécanisme ont été fait chez le poisson zèbre. En effet, différentes études démontrent que la transplantation de neurones FBM contrôlés dans un hôte muté pour *vangl2*, *Fzd3* ou *Celsr2* perdent la capacité de migrer caudalement (Bingham et al., 2002; Tissir and Goffinet, 2013; Wada et al., 2006). Ce qui démontre une fonction autonome et non autonome de ces gènes dans ce modèle.

D. Déficits et pathologies associées à des mutations précoces

1. Développement et pathologies associées à des malformations du corps calleux

Le cerveau est composé de de trois commissures interhémisphériques qui sont (1) la commissure antérieure, (2) la commissure hippocampique, et (3) le corps calleux (*figure 21A*). Contrairement à la commissure antérieure et à la commissure hippocampique, le corps calleux n'est présent que chez les mammifères placentaires, ce qui suggère qu'il résulte d'un mécanisme d'évolution. La zone du cerveau traversée à la fois par ces trois commissures est appelée plaque commissurale.

Parmi ces liens interhémisphériques, le corps calleux est la commissure la plus large formée uniquement de matière blanche correspondant à des fibres axonales. A la naissance elle est composée de 200 millions de fibres qui vont mûrir pendant l'enfance grâce au mécanisme de myélinisation (van der Knaap and van der Ham, 2011). Cette commissure est formée de faisceaux axonaux en provenance des neurones corticaux qui projettent sur l'hémisphère controlatéral. Les axones commissuraux doivent donc traverser la ligne médiane (Midline Glia (MG)) grâce au processus de migration neuronale et plus précisément au mécanisme d'attraction répulsion (*figure 21B*). Pour cela, le chemin des axones commissuraux est bordé de l'indusium griseum Glia (IGG) en partie dorsomédiale, de la glial wedge dans sa partie ventrolatérale et des cellules de la MG dans sa partie ventromédiale. A E13 chez la souris, ces cellules sécrètent des facteurs chémoattractants ou chémorépulseurs afin de guider l'axone. A E15, les neurones du cortex cingulaire sont les premiers neurones qui émettent des projections controlatérales, suivis un jour plus tard par les axones commissuraux. Après avoir traversé la zone médiane, les axones commissuraux vont alors innover les différentes régions cibles du cortex (Donahoo and Richards, 2009). Au cours du développement, la mise en place du corps calleux fait appel à deux guides qui sont dans la partie antérieure les axones du cortex cingulaire et au niveau postérieur les axones de la commissure hippocampique (*figure 21B*) (Suárez et al., 2014).

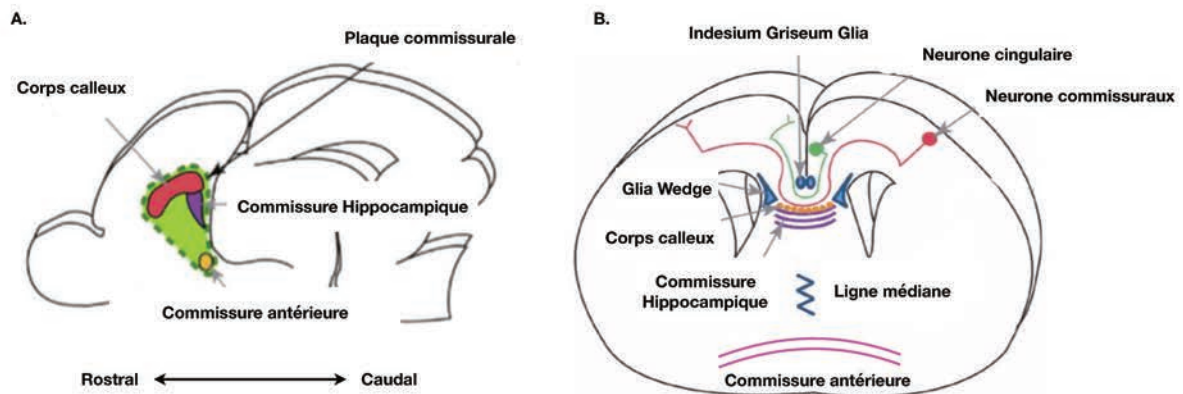


Figure 21 : Représentation schématique des commissures dans le cerveau de souris. (A) Représentation d'une coupe sagittale d'un cerveau de souris avec les différentes commissures ; (B) Représentation d'une coupe coronale de cerveau de souris avec les différentes commissures. (adapté de (Donahoo and Richards, 2009))

Différentes malformations du corps calleux sont connues à ce jour :

- Agénésie du corps calleux qui correspond à une absence totale du corps calleux souvent induite par une perturbation de la croissance axonale avec les axones commissuraux qui ne croisent pas la MG ;
- Dysplasie du corps calleux qui correspond à une absence partielle de certaines parties du corps calleux. Cette anomalie est souvent due à une perturbation de la croissance des axones cingulaires (si absence de la partie antérieure du corps calleux) ou des axones de la commissure hippocampique (si absence de la partie postérieure du corps calleux) ;
- Hypoplasie du corps calleux qui correspond à un corps calleux anormalement fin souvent engendrée par une anomalie du nombre de neurones corticaux disponibles pour sa formation (Suárez et al., 2014).

Celsr3 et *Fz3* ont été décrits comme étant cruciaux au développement axonal. La mutation de ces gènes est en lien avec des perturbations de la mise en place de la commissure antérieure, du corps calleux et du tractus thalamocortical (Tissir et al., 2005; Wang et al., 2002). La perturbation morphologique de cette commissure est connue pour être associée avec des pathologies psychiatriques chez l'homme telles que la schizophrénie, l'autisme, le trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité (ADHD), le trouble de la personnalité, l'épilepsie ou encore la bipolarité (van der Knaap and van der Ham, 2011; Unterberger et al., 2016).

2. Hétérotopies, lissencéphalies, polymicrogyries et microcéphalie

La perturbation de la prolifération, de la division des progéniteurs neuronaux ou de la migration radiale induites par des mutations génétiques sont à l'origine de malformations du SNC chez l'homme. Plus précisément, la perturbation de la division ou de la prolifération des progéniteurs neuronaux est à l'origine de microcéphalies, c'est-à-dire un cerveau anormalement petit. Quant aux lissencéphalies (absence des circonvolutions à la surface du cerveau) ou aux hétérotopies (migration ectopique des neurones) et polymicrogyries (présence anormalement élevée de circonvolutions), elles sont induites par une perturbation de la migration radiale des neurones corticaux et de l'organisation de ces neurones au sein des couches corticales (Buchsbaum and Cappello, 2019a; Pang et al., 2008). Ces anomalies de migration sont souvent causées par des affections du cytosquelette de tubuline. En effet, dans le cas de la tubulinopathie liée à la mutation des gènes *Lis1* (Lissencephaly type I) ou *DCX* (Double Cortin) qui sont des protéines stabilisatrices des microtubules, on retrouve des lissencéphalies et des hétérotopies.

La perturbation de la migration neuronale n'est pas la seule origine de ces anomalies corticales. En effet, la mise en place de cette organisation et de cette architecture bien spécifique du cortex est déterminée par une parfaite coordination de la division asymétrique et symétrique des cellules progénitrices. Une perturbation du ratio progéniteurs/neurones modifie l'architecture du cortex et favorise une mauvaise répartition des neurones et des progéniteurs au sein des différentes couches du cortex (Buchsbaum and Cappello, 2019b; Peyre and Morin, 2012). Bien que ce mécanisme ne soit pas totalement élucidé, les complexes protéiques formés de *Gpsm2/Gai/Insc* et *Par3/Par6/aPKC* sont connus pour avoir un rôle crucial dans ce mécanisme. La perturbation de ce mécanisme est directement en lien avec des pathologies neuronales telles que la microcéphalie. Plus précisément, ce phénotype est causé par un épuisement précoce du stock de progéniteurs induit par une augmentation du nombre de division asymétrique des cellules progénitrices. De plus, des études ont aussi montré que la perturbation de l'expression des protéines apicales telles que *Par3* ou *Par6* influence le devenir cellulaire. En effet, une surexpression de *Par3* ou de *Par6* va favoriser le renouvellement des cellules progénitrices alors qu'à l'inverse une déplétion en *Par3* augmente la sortie du cycle cellulaire et donc la production de neurones (Bultje et al., 2009; Costa et al., 2008). Mais d'autres protéines du complexe de polarité A-B jouent un rôle dans cette fonction. En effet, il a été démontré que la mutation de *Pals1* conduit aussi à une sortie prématurée du cycle cellulaire des cellules progénitrices et par conséquent à une synthèse précoce de neurones. Dans cet exemple, cette mutation engendre aussi un phénotype cérébral sévère avec une forte mort cellulaire à l'origine d'un faible

développement cortical. Ces résultats démontrent une nouvelle fonction de cette protéine dans la survie cellulaire (Kim et al., 2010).

3. Hydrocéphalies

Le cerveau et la moelle épinière baignent dans le liquide céphalorachidien (LCR). La fonction principale de ce liquide est d'absorber et d'amortir les mouvements ou les chocs qui risqueraient d'endommager le cerveau. La circulation de ce liquide permet aussi d'évacuer les déchets produits par le fonctionnement cérébral et d'assurer une protection immunologique. De ce fait, sa composition reflète alors l'état physiopathologique du cerveau : inflammation, infection, présence de molécules pharmacologiques, etc. Afin de maintenir une certaine homéostasie le renouvellement se fait tous les 3 à 4 jours. Une perturbation de ce mécanisme est en lien direct avec des hydrocéphalies, c'est à dire une accumulation anormale du LCR dans les ventricules.

Le LCR est sécrété à 75 % par les cellules du plexus choroïde au niveau des ventricules latéraux et à 25% par les cellules épendymaires qui bordent les ventricules. Les cellules épendymaires sont des cellules épithéliales qui possèdent à leur surface apicale de nombreux cils qui battent de façon coordonné dans une seule direction. Ce mouvement craie un flux liquidien nécessaire à l'écoulement du LCR des ventricules latéraux vers le 3^{ème} puis le 4^{ème} ventricule avant sa distribution dans l'espace subarachnoïdien (*figure 22*) (Bothwell et al., 2019; Khasawneh et al., 2018). Les gènes centraux de la PCP jouent un rôle central dans le positionnement correct des cils à la surface des cellules épendymaires. En effet, la mutation de *Celsr2*, *Celsr3* ou *vangl2* chez la souris conduit à une orientation aléatoire des cils à la surface apicale des cellules épendymaires à l'origine d'une perturbation du flux liquidien du LCR et par conséquent à des hydrocéphalies (Guirao et al., 2010; Tissir et al., 2010).

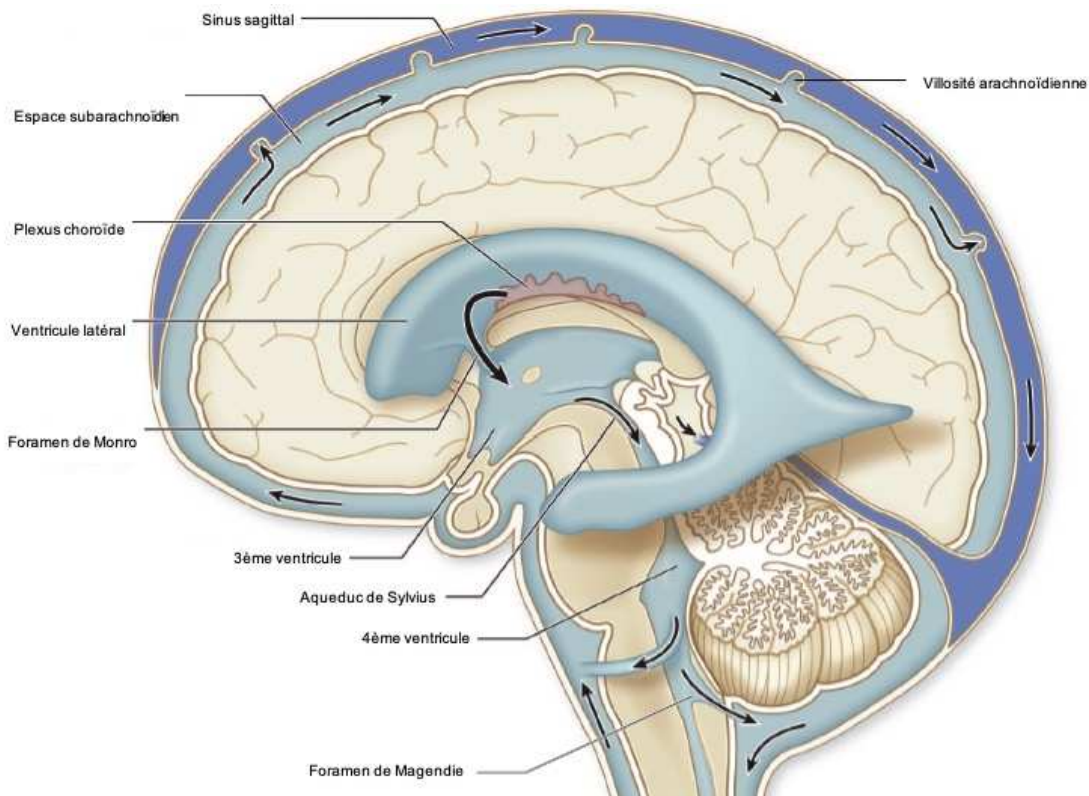


Figure 22 : Représentation schématique d'une coupe sagittale de cerveau humain représentant la production et la circulation du liquide céphalorachidien. Flèche noir : sens de circulation du liquide céphalorachidien. (adapté de *Neurology.mhmedical.com*)

Les hydrocéphalies congénitales (HC) (acquises dès la naissance) sont des pathologies cérébrales sévères avec une forte mortalité qui affecte 4,65 sur 10000 naissances. Elles sont caractérisées par une accumulation de LCR dans les ventricules cérébraux engendrant un élargissement des ventricules. Il existe deux catégories d'HC : gonosomique (mutation portée par les chromosomes sexuels) ou autosomique (mutation portée par les chromosomes non sexuels).

Parmi les HC gonosomique deux gènes sont particulièrement connus pour être en lien avec cette pathologie : *L1CAM* et *AP1S2* (Shaheen et al., 2017). Ces mutations portées par le chromosome X, sont des HC non syndromique (sans autre anomalie cérébrale) causées par une obstruction de l'aqueduc de Sylvius (zone de communication entre le 3^{ème} et le 4^{ème} ventricule cérébrale).

A ce jour, pour les HC autosomiques récessives quatre gènes ont été mis en cause : *Daple* (Dvl1-associating proteins with a high frequency of leucine aussi appelée *Hyc1* ou *CCDC88C*) (Drielsma et al., 2012; Ekici et al., 2010; Ruggeri et al., 2018), *Mpdz* (Multiple PDZ domain protein

aussi appelée *Hyc2* ou *Mupp1*) (Al-Dosari et al., 2013; Al-Jezawi et al., 2018; Saugier-Weber et al., 2017; Shaheen et al., 2017), *WDR81* (WD repeat-containing proteins 81 aussi appelé *Hyc3*) (Alazami et al., 2015; Cappuccio et al., 2017; Cavallin et al., 2017; Gulsuner et al., 2011; Komara et al., 2016; Shaheen et al., 2017) et *EML1* (Echinoderm microtubule-associated protein like 1) (Kielar et al., 2014; Shaheen et al., 2017). L'ensemble des mutations et des phénotypes induits par ces gènes ont été détaillés en annexe (*tableau 5 et figure 33*).

Bien que l'origine de ces hydrocéphalies ne soient pas encore totalement élucidée, le Dr Feldner découvre l'origine de cette anomalie chez des souris mutées pour le gène *Mpdz* (*Mpdz*^{-/-}) (Feldner et al., 2017a). Ces souris meurent à trois semaines des suites d'une hydrocéphalie sévère. La protéine Mpdz, connue pour son rôle dans la mise en place de la polarité apicale, est aussi indispensable pour l'intégrité des TJ grâce à ses interactions avec les protéines constituant ces jonctions (Adachi et al., 2009). Il a découvert une perte de l'intégrité des cellules épendymaires avec une augmentation de la mort cellulaire de ces cellules. Ils affirment que cette délamination est à l'origine de l'hydrocéphalie causée par une sténose de l'aqueduc de Sylvius. Par conséquent, le LCR ne peut plus s'écouler, entraînant une accumulation de ce liquide dans les ventricules à l'origine de l'hydrocéphalie et de la mort de ces animaux (Feldner et al., 2017b). Récemment, le Dr Yang vient compléter l'analyse du Dr Feldner en démontrant une altération des TJ dans un modèle murin similaire. Cette altération serait la cause première de l'hydrocéphalie. En effet, l'altération des TJ conduirait à la perte de l'intégrité des cellules épendymaires, à la sténose de l'aqueduc de Sylvius et donc à l'hydrocéphalie (Yang et al., 2019). Bien que *Daple* appartienne à la même famille des HC que *Mpdz*, l'origine des hydrocéphalies semble différente chez la souris mutée pour *Daple*. En effet, le Dr Takagishi démontre un défaut d'orientation des cils à la surface apicale des cellules épendymaires entraînant une altération de la circulation du LCR à l'origine de l'hydrocéphalie chez la souris mutées pour *Daple* (Takagishi et al., 2017).

Chapitre IV : Le Chudley McCullough Syndrome (CMCS)

A. La pathologie

En 1997, les Dr McCullough et le Dr Chudley ont décrit pour la première fois dans une famille consanguine une pathologie caractérisée par une surdité neurosensorielle bilatérale accompagnée d'une hydrocéphalie causée par une obstruction du foramen de Monro (jonction entre les ventricules latéraux et le 3^{ème} ventricule) (Chudley et al., 1997). Cette pathologie sera alors nommée le syndrome de Chudley McCullough (CMCS ; OMIM 604213). La grande particularité de ce syndrome rare (prévalence inférieure à 1/1.000.000) est d'affecter deux structures : l'oreille interne et le SNC (Walsh et al., 2010; Yariz et al., 2012). Ces patients présentent des surdités sévères et précoces associées à un éventail d'anomalies cérébrales dont une systématiquement décrite : une hypoplasie du corps calleux. Au début de ma thèse, les bases moléculaires de cette pathologie étaient encore inconnues empêchant le développement de stratégies thérapeutiques. L'identification de mutations dans le gène *GPSM2* comme causative de la pathologie a amené certains scientifiques à suggérer qu'une dérégulation de la division asymétrique était à la base de la pathologie (Diaz-Horta et al., 2012; Doherty et al., 2012; Walsh et al., 2010). Sachant que la protéine Gpsm2 module la dynamique du cytosquelette de tubuline lors de la division asymétrique des cellules on pouvait penser que cette fonction était en lien avec les anomalies observées chez ces patients. Si cette hypothèse (non vérifiée) était plausible, elle ne semblait pas suffisante pour expliquer les surdités ou même des anomalies du SNC suggérant des problèmes de migration neuronale. A ce jour, douze mutations sur *GPSM2* ont été identifiées chez des patients diagnostiqués pour cette maladie. Ces mutations engendrent toutes une forme tronquée de la protéine avec pour chaque patient des surdités profondes et précoces associées à différentes anomalies cérébrales plus ou moins sévères (*figure 23 et tableau 2*).

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
Nom de la mutation	c.379C>T R127X	c.1661C>A + c.741delC S554X + N247NfsX34	c.1471delG or c.1473delG G491GfsX6	c.741delC or c.742delC N247NfsX34	c.1684C>T G562X							
Mutation sur l'ADN	Walsh et al., 2012	Doherty et al., 2012	Doherty et al., 2012	Doherty et al., 2012 ; (Almomani et al., 2012)	Pogjesser et al., 2017							
Mutation sur la protéine	28 ans	10 ans	12 ans	17 ans	21 ans	2 ans	37 ans	36 ans	16 ans	12 ans	16 ans	
Référence	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Yariz et al., 2012
Âge	Court et fin	Oui (postérieur)	Oui (postérieur)	Oui (postérieur)	Oui (postérieur)	Oui (postérieur)	Oui (postérieur)	Oui (postérieur)	Oui (Court et fin)	Oui (Court et fin)	Oui (Court et fin)	Oui (Court et fin)
Ventriculomégalie	Moderé	Petit	Moderé	Petit	Petit	Important	Important	Oui	Petit	Petit	Moderé	Petit
Corps calleux	Moderé	Moderé	Moderé	Moderé	Moderé	Important	Important	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Hétérotopie frontale	Moderé	Moderé	Moderé	Moderé	Moderé	Important	Important	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Polymicrogyrie frontale	Moderé	Moderé	Moderé	Moderé	Moderé	Important	Important	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Dysplasie du cervelet	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Kystes arachnoïdiens	Moderé	Moderé	Moderé	Moderé	Moderé	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Macrocéphalie	Moderé	Moderé	Moderé	Moderé	Moderé	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Colpocephalie	Moderé	Moderé	Moderé	Moderé	Moderé	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Colpocephalie	Moderé	Moderé	Moderé	Moderé	Moderé	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Retard moteur	Non	Non	Non	Non	Non	Moyen	Moyen	Non	Moyen	Non	Non	Non
Retard de communication	Non	Non	Non	Non	Non	Moyen	Moyen	Non	Moyen	Non	Non	Non
Troubles cognitifs	Non	Moyen	Non	Non	Moyen	Non	Moyen	Non	Oui (Retard intellectuel)	Non	Non	Non
Nom de la mutation												
Mutation sur l'ADN	c.1684C>T G562X		c.1473delG + c.742delC P492SfsX5	c.742delC + c.1492C>T G249EfsX32 + R498X	c.832C>T R278X	c.1062+1G>T R318RfsX8	c.1473delG + c.742delC P492SfsX5	c.742delC + c.1492C>T G249EfsX32 + R498X	c.1065C>A S352X	c.832C>T R278X	c.1093C>T T	c.977C>T W326X
Mutation sur la protéine	Yariz et al., 2012	Doherty et al., 2012	Chapman et al., 2016	Diaz-Horta et al., 2012	Almomani et al., 2012	Chapman et al., 2016	Almomani et al., 2012	Diaz-Horta et al., 2012	Hamzeh et al., 2016	Atik et al., 2015	Koenigstein et al., 2016	Bronker et al., 2015
Référence	16 ans	12 ans	7 ans	6 ans	33 weeks	17 ans	25 ans	12 ans	11 ans	11 ans	11 ans	11 ans
Âge	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non
Ventriculomégalie	Oui (Court et fin)	Oui (Court et fin)	Oui (postérieur)	Oui (postérieur)	Oui (postérieur)	Oui (postérieur)	Oui (postérieur)	Oui (postérieur)	Oui (partiel)	Oui (partiel)	Oui (partiel)	Oui (partiel)
Corps calleux	Petit	Moderé	Large	Moderé	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non
Hétérotopie frontale	Subtile	Subtile	Important	Important	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non
Polymicrogyrie frontale	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non
Dysplasie du cervelet	Moderé	Moderé	Large	Moderé	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Kystes arachnoïdiens	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macrocéphalie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Colpocephalie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retard moteur	Non	Non	Moyen	Moyen	Non	Moyen	Non	Non	-	-	-	Oui
Retard de communication	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-	-	-	-
Troubles cognitifs	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-	-	-	Oui (Retard intellectuel)

Tableau 2 : Résumé des différentes mutations de *Gpsm2* et leurs phénotypes associés. Pour simplifier, chaque mutation a été arbitrairement appelée M#.

B. Modèles murins pour *Gpsm2* et *Gnai3*

Sachant qu'il y a entre 91 et 94% de similarité entre la protéine *Gpsm2* humaine et murine, l'étude de l'origine des pathologies du CMCS chez la souris est pertinente. A ce jour, trois souris mutées pour *Gpsm2* ont été décrites ainsi que trois souris mutées pour *Gnai* (gène codant pour les protéines *Gαi*). L'ensemble des phénotypes retrouvés chez ces souris ont été décrit dans la *tableau 3* (*figure 23*).

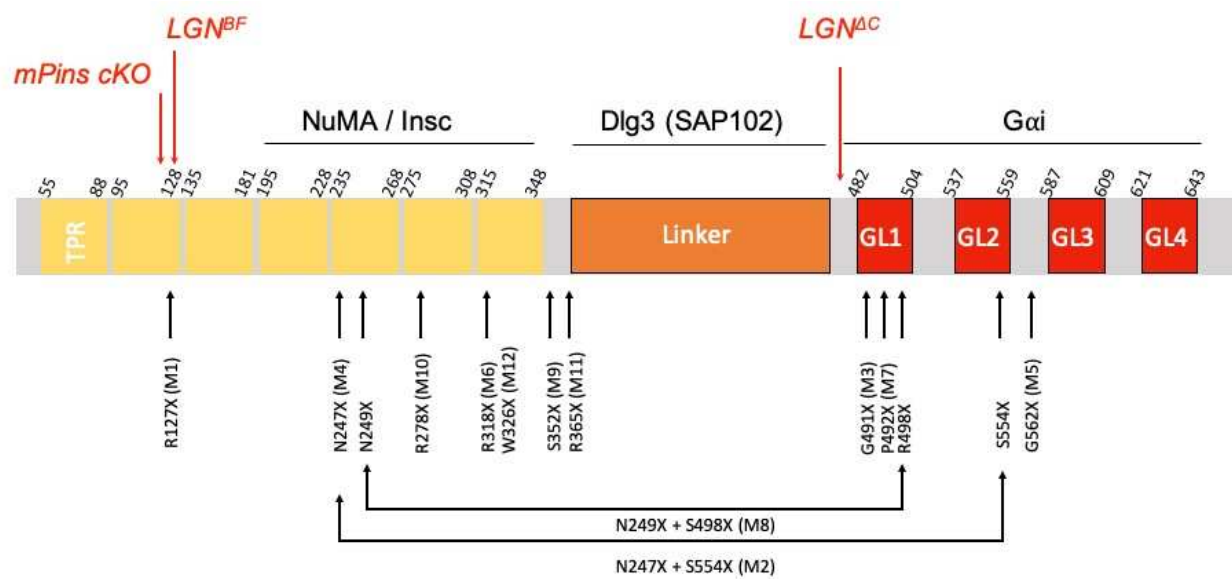


Figure 23 : Représentation schématique de la protéine *Gpsm2*. Sur cette représentation, en dessous de la schématisation de la protéine, chaque mutation est indiquée par une flèche noire. Le numéro que nous avons donné à ces mutations est indiqué entre parenthèse (M#) et décrit dans le *tableau 3*. Au dessus de cette schématisation, on retrouve en rouge les formes tronquées de cette protéine retrouvées chez les modèles murins décrits dans la littérature et les lignes noires correspondent aux interactions de cette protéine. TPR : domaines Tetratricopeptide Repeat ; GL# : domaines GoLoco.

Gène	Souris mutante	Mutation genome	Phénotypes auditifs	Phénotype cérébraux	Références
Gpsm2/LGN/mPins	LGN ^{ΔC}	Délétion de l'exon 13, 14 et une partie du 15 / Expression des domaines TPR et du linker de la protéine	-	Orientation aléatoire du fuseau mitotique de division ; Marqueurs PAX6 et Tbr1 sont affectés (extension de leurs domaines) ; Epuisement des progéniteurs neuronaux	Konno et al., 2008
	LGN ^{ΔF}	Délétion de l'exon 5 / Expression de seulement 3 domaines TPR	Analyse faite sur des images obtenues en microscopie électronique à balayage et par immunomarquage : Mauvais positionnement du kinocil ; touffe ciliaire aplatie, souvent fragmentée et mal orientée ; gradient de sévérité CCI<CCE1<CCE2<CCE3	-	Tarchini et al., 2013
	mPins cKO	Délétion de l'exon 5-7/ Expression de seulement 3 domaines TPR	Analyse faite par immunomarquage : Mauvais positionnement du kinocil ; touffe ciliaire aplatie, souvent fragmentée et mal orientée ; gradient de sévérité CCI<CCE1<CCE2<CCE3	-	Ezan et al., 2013
Gnai	Gai PTXa Foxg1	Inhibition des trois isoformes de Gai présente dans l'oreille interne très tôt au cours du développement (pendant la formation de l'otocyste)	Meurt rapidement après la naissance		Tarchini et al., 2013
	Gai Atho1 PTXa	Inhibition des trois isoformes de Gai présente dans l'oreille interne (Dans les CC post mitotique)	Analyse faite sur des images obtenues en microscopie électronique à balayage et par immunomarquage : Mauvaise orientation de la touffe ciliaire, touffe ciliaire aplatie, plus de rangées de stéréocils, stéréocils plus courts, faible forme en escalier de la touffe ciliaire, stéréocils plus épais.	-	Tarchini et al., 2013
	Gai3 Foxg1	Absence d'expression de Gai3 présente dans l'oreille interne très tôt au cours du développement (pendant la formation de l'otocyste)	Analyse faite par immunomarquage : touffe ciliaire aplatie, position centrale du kinocil, touffe ciliaire fragmentées, défaut d'orientation de la touffe ciliaire principalement dans les CCE1 et CCE2	-	Ezan et al., 2013

Tableau 3 : Résumé des phénotypes cochléaires et cérébraux retrouvés chez des souris mutées pour Gpsm2 ou Gnai.

Objectifs

A. Etablir la fonction du complexe Gpsm2/Gai3 sur le système auditif et cérébral

Dans le but de déterminer l'origine des surdités et des anomalies cérébrales présentes chez les patients atteints du CMCS, notre équipe a développé quatre souris mutées pour *Gpsm2* et *Gnai3* (gène codant pour la protéine Gai3) :

- Deux souris mutées pour *Gpsm2* ou *Gnai3* sous la dépendance du promoteur Foxg1 (*Gpsm2^{Foxg1}* et *Gnai3^{Foxg1}*) pour permettre une délétion de ces gènes dans différentes structures cérébrales dont l'otocyste très tôt au cours du développement (E8,5) ;
- Une souris mutée pour *Gpsm2* sous la dépendance du promoteur Pou4f3 (*Gpsm2^{Pou4f3}*) permettant une délétion de ce gène spécifiquement dans les CC post-mitotiques (E13,5) ;
- Une souris mutée pour *Gpsm2* sous la dépendance du promoteur Emx1 (*Gpsm2^{Emx1}*) permettant une délétion de ce gène très tôt au cours du développement dans le télencéphale dorsal.

1. Identification de la fonction du complexe Gpsm2/Gai3 sur la fonction auditive

Afin d'identifier l'impact de la mutation de *Gpsm2* et *Gnai3* sur la fonction auditive, nous avons fait une analyse morphologique de la surface apicale de l'organe de Corti grâce à des images obtenues en microscopie électronique à balayage mais aussi grâce à des immunomarquages. Afin de déterminer des déficits fonctionnels chez ces animaux, des tests auditifs et comportementaux ont été réalisés.

2. Identification de la fonction du complexe Gpsm2/Gai3 au niveau cérébral

L'origine ainsi que la variabilité des anomalies cérébrales décrites chez les patients atteints du CMCS restent inexplicées. L'hypoplasie du corps calleux est une anomalie cérébrale systématiquement décrite chez ces patients. Cette malformation peut être expliquée par un défaut dans la motilité neuronale. Dans un premier temps nous avons fait une analyse structurale du cerveau des souris *Gpsm2^{Emx1}*. Puis, nous avons analysé la motilité neuronale dans des neurones en culture provenant de souris contrôles et de souris *Gpsm2^{Emx1}*.

3. Identification des bases moléculaires du CMCS

A ce jour, aucune base moléculaire n'a été décrite pour le CMCS. En se basant sur nos données préliminaires qui montraient un profil d'expression du complexe Gpsm2/Gai3 similaire à

celui des protéines du complexe Myo15 (formé des protéines Myo15, Whirlin et Eps8), nous avons émis l'hypothèse que le complexe Gpsm2/Gai3 interagissait avec le complexe de la Myo15. Dans un premier temps, nous avons analysé le profil d'expression de ces protéines en simple et co-transfection dans des cellules COS-7. Puis, nous avons validé à l'aide de tests biochimiques les interactions protéiques ainsi que les domaines d'interaction entre les protéines de ces deux complexes. Nous avons également émis l'hypothèse que la variabilité de phénotypes cérébraux observés chez ces patients était causée par des impacts fonctionnels différents des formes tronquées de Gpsm2 retrouvées chez ces patients. Afin de le valider, nous avons généré des plasmides codants pour des formes tronquées de Gpsm2 retrouvées chez ces patients et nous avons analysé l'impact de ces différentes formes tronquées *in vitro* sur des cellules COS-7.

4. Identification d'une nouvelle fonction moléculaire pour le complexe Gpsm2/Gai3

Nous avons observé que la majorité des phénotypes présents chez les patients du CMCS pouvaient être expliqués par une perturbation de la dynamique d'actine. Nous avons donc émis l'hypothèse que le complexe Gpsm2/Gai3 aurait une nouvelle fonction moléculaire encore inconnue sur la modulation du cytosquelette d'actine. Afin de valider cette hypothèse nous avons testé l'influence de ces protéines *in vitro* à l'aide d'un test de polymérisation d'actine.

Si ces hypothèses s'avéraient correctes, nous démontrerions pour la première fois l'origine des surdités et des anomalies cérébrales chez les patients atteints du CMCS ainsi qu'une nouvelle base moléculaire pour cette pathologie indispensable à la mise en place de traitements.

B. Découverte des protéines impliquées dans le recrutement/maintien des protéines Gpsm2/Gai3 à la surface apicale des CC

En 2013, notre équipe ainsi qu'une équipe canadienne ont démontré l'importance de l'accumulation asymétrique de Gpsm2/Gai3 à la surface apicale des CC sur la mise en place de l'axe de la PCP dans l'oreille interne (Ezan et al., 2013; Tarchini et al., 2013). Cependant, aucune donnée n'existe sur les protéines permettant le recrutement apical et la stabilité de ce complexe à la surface apicale des CC. Dans cette seconde partie, notre objectif est donc d'identifier les complexes protéiques essentiels à cette fonction. Pour cela nous avons émis l'hypothèse que les complexes de polarité apicale seraient de bons candidats. Deux complexes apicaux participent à la mise en place de la polarité apicale des cellules épithéliales : (1) Par3/Par6/aPKC (complexe Par) et (2) Pals1/Patj-Mpdz/Crumbs (complexe Crumbs). Sachant que les données précédentes du laboratoire ont démontré que la distribution de Par6 et aPKC est diamétralement opposée à

celle de *Gpsm2/Gai3* (Ezan et al., 2013), nous avons exclu la possibilité que ce complexe puisse interagir avec les protéines *Gpsm2* et *Gai3*. En revanche, nous avons émis l'hypothèse que le complexe *Crumbs* serait un bon candidat. Cette hypothèse est appuyé par de récentes études qui suggèrent que *Mpdz* serait en lien avec des surdités, tout comme *Gpsm2* (Bowl et al., 2017; Shaheen et al., 2017). De plus, la mutation de *Mpdz* est connue pour être en lien avec des hydrocéphalies chez l'homme, un des phénotypes retrouvés chez les patients du CMCS. Ces similarités renforcent l'idée d'un lien entre les protéines du complexe *Crumbs* et le complexe *Gpsm2/Gai3*. Nous pensons également, que *Mpdz* serait essentielle à la fonction auditive. Pour cette étude, nous avons donc généré des souris mutées pour *Mpdz* sous la dépendance du promoteur *Foxg1* (*Mpdz^{Foxg1}*) ou *Emx1* (*Mpdz^{Emx1}*) afin de réaliser une analyse à la fois au niveau auditif et cérébral.

1. Identification du profil d'expression des protéines du complexe *Crumbs*

Dans un premier temps, à l'aide de marquages immunohistochimiques de l'épithélium auditif, nous souhaitons déterminer le profil spatio-temporel des différentes protéines qui constituent le complexe *Crumbs*. Puis, nous souhaitons mettre en évidence des co-localisations entre ces protéines et les protéines du complexe *Gpsm2/Gai3*. Enfin, nous voulons analyser si le profil d'expression des protéines du complexe *Crumbs* et *Gpsm2/Gai3* est perturbé chez les souris *Gpsm2^{Foxg1}* et *Mpdz^{Foxg1}*.

2. Découverte des liens moléculaires entre les protéines du complexe *Crumbs* et *Gpsm2/Gai3*

A l'aide de constructions plasmidiques codant pour les protéines du complexe *Crumbs* et *Gpsm2/Gai3*, nous souhaitons analyser les possibles co-localisations entre ces protéines *in vitro* dans des cellules COS-7. Puis, après avoir défini de possibles partenaires protéiques, nous testerons ces possibles interactions à l'aide de tests biochimiques (Immunoprécipitations).

3. Identification des déficits morphologiques et fonctionnels des souris *Mpdz^{Foxg1}*

Des études récentes suggèrent que *Mpdz* serait un nouveau gène de la surdité (Bowl et al., 2017; Shaheen et al., 2017). Afin de le valider, nous analyserons l'épithélium auditif des souris *Mpdz^{Foxg1}* à différents stades de développement en pré et post-natal. De plus, des tests auditifs seront réalisés chez ces animaux.

4. Analyse structurelle du cerveau chez les souris *Mpdz*^{Emx1}

De récentes études décrivent l'effet de la mutation de *Mpdz* sur les cellules épendymaires à l'origine des hydrocéphalies chez ces animaux (Feldner et al., 2017b; Yang et al., 2019). Au vu de la sévérité de ces hydrocéphalies et de la mort précoce de ces animaux il est difficile de déterminer si d'autres anomalies cérébrales peuvent être causées par la mutation de ce gène. Par conséquent, grâce à notre modèle murin *Mpdz*^{Emx1} qui possède une délétion de *Mpdz* au niveau cérébral mais pas dans les cellules épendymaires, nous souhaitons réaliser une analyse structurelle du cerveau chez ces animaux.

Ces résultats originaux démontreraient pour la première fois un nouveau gène de la surdité ainsi qu'une nouvelle base moléculaire en lien avec la voie de signalisation dépendant des protéines Gi.

Résultats

Article 1 :

Defective Gpsm2/Gai3 signalling disrupts stereocilia development and growth cone actin dynamics in Chudley-McCullough Syndrome

Article 2 :

Gai proteins are indispensable for hearing

Defective Gpsm2/G α i3 signalling disrupts stereocilia development and growth cone actin dynamics in Chudley-McCullough Syndrome

Stephanie A. Mauriac, Yeri E. Hien, Jonathan E. Bird, Steve Dos-Santos Carvalho, Ronan Peyroulou, Sze Chim Lee, Maite M. Moreau, Jean-Michel Blanc, Aysegul Geyser, Chantal Medina, Olivier Thoumine, Sandra Beer-Hammer, Thomas B. Friedman, Lukas Rüttiger, Andrew Forge, Bernd Nürnberg, Nathalie Sans & Mireille Montcouquiol.

(article publié dans Nature communication en 2017)

Introduction

La surdité est le déficit sensoriel le plus fréquent qui touche près de 460 millions de personnes dans le monde. Parmi ces surdités, le Chudley McCullough Syndrome (CMCS) est une pathologie neurologique autosomique récessive rare caractérisée par une surdité sévère et précoce ainsi que de nombreuses anomalies cérébrales, dont systématiquement une hypoplasie du corps calleux (Chudley et al., 1997). Bien que les bases moléculaires de cette pathologie ne soient pas encore élucidées, le gène *GPSM2* a été décrit comme étant causatif de cette pathologie (Diaz-Horta et al., 2012; Doherty et al., 2012; Walsh et al., 2010). Notre objectif a donc été de déchiffrer les bases moléculaires de cette pathologie et de déterminer l'origine des surdités et des anomalies cérébrales décrites chez ces patients.

Résultats

- *Gpsm2* et *Gai3* définissent un nanodomaine, co-localisant avec *Eps8*, au sommet des stéréocils de la plus grande rangée.
- L'absence de *Gpsm2* ou *Gai3* engendre des stéréocils plus courts avec un plus grand nombre de stéréocils par CCI, phénotype similaire à l'absence des protéines du complexe *Myo15*.
- Les souris mutées pour *Gpsm2* sont profondément sourdes avec un déficit vestibulaire. Les souris mutées pour *Gnai3* présentent une baisse du seuil auditive uniquement dans les hautes fréquences.
- Un nouvel interacteur pour *Gpsm2* est découvert : la *Whirlin*.
- La mutation de *Gpsm2*, mais pas de *Gnai3*, conduit à une hypoplasie du corps calleux et une réduction de la motilité neuronale.
- Une nouvelle fonction moléculaire pour le complexe *Gpsm2/Gai3* sur la modulation du cytosquelette d'actine.

Conclusion

Nous démontrons une nouvelle base moléculaire commune conduisant à une surdité et une hypoplasie du corps calleux. Nous démontrons l'existence d'un nouveau partenaire pour *Gpsm2*, ainsi qu'une nouvelle fonction du complexe *Gpsm2/Gai3* sur la modulation du cytosquelette d'actine. On peut donc penser que le rôle multifonctionnel de ce complexe serait à l'origine de la variabilité des phénotypes cérébraux retrouvés chez ces patients.

ARTICLE

Received 14 Jun 2016 | Accepted 13 Feb 2017 | Published 7 Apr 2017 | Updated 25 May 2018

DOI: 10.1038/ncomms14907

OPEN

Defective *Gpsm2*/ $G\alpha_{i3}$ signalling disrupts stereocilia development and growth cone actin dynamics in Chudley-McCullough syndrome

Stephanie A. Mauriac^{1,2,*}, Yeri E. Hien^{1,2,*}, Jonathan E. Bird³, Steve Dos-Santos Carvalho^{1,2}, Ronan Peyroutou^{1,2}, Sze Chim Lee⁴, Maïte M. Moreau^{1,2}, Jean-Michel Blanc^{2,5}, Aysegül Gezer^{1,2,†}, Chantal Medina^{1,2}, Olivier Thoumine^{6,7}, Sandra Beer-Hammer⁸, Thomas B. Friedman³, Lukas Rüttiger⁴, Andrew Forge⁹, Bernd Nürnberg^{8,**}, Nathalie Sans^{1,**} & Mireille Montcouquiol^{1,**}

Mutations in *GPSM2* cause Chudley-McCullough syndrome (CMCS), an autosomal recessive neurological disorder characterized by early-onset sensorineural deafness and brain anomalies. Here, we show that mutation of the mouse orthologue of *GPSM2* affects actin-rich stereocilia elongation in auditory and vestibular hair cells, causing deafness and balance defects. The G-protein subunit $G\alpha_{i3}$, a well-documented partner of *Gpsm2*, participates in the elongation process, and its absence also causes hearing deficits. We show that *Gpsm2* defines an ~200 nm nanodomain at the tips of stereocilia and this localization requires the presence of $G\alpha_{i3}$, myosin 15 and whirlin. Using single-molecule tracking, we report that loss of *Gpsm2* leads to decreased outgrowth and a disruption of actin dynamics in neuronal growth cones. Our results elucidate the aetiology of CMCS and highlight a new molecular role for *Gpsm2*/ $G\alpha_{i3}$ in the regulation of actin dynamics in epithelial and neuronal tissues.

¹INSERM, Neurocentre Magendie, U1215, 146 rue Leo-Saignat, F-33077 Bordeaux, France. ²Univ. Bordeaux, Neurocentre Magendie, U1215, F-33077 Bordeaux, France. ³Section on Human Genetics, National Institute on Deafness and Other Communication Disorders, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA. ⁴Department of Otolaryngology, Hearing Research Centre Tübingen, Molecular Physiology of Hearing, University of Tübingen, D-72076 Tübingen, Germany. ⁵Biochemistry and Biophysics Facility of the Bordeaux Neurocampus, F-33077 Bordeaux, France. ⁶CNRS, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, UMR 5297, 146 rue Leo-Saignat, F-33077 Bordeaux, France. ⁷Univ. Bordeaux, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, UMR 5297, F-33077 Bordeaux, France. ⁸Department of Pharmacology and Experimental Therapy and Interfaculty Center of Pharmacogenomics and Drug Research, University of Tübingen, 72074 Tübingen, Germany. ⁹UCL Ear Institute, London WC1X 8EE, UK. † Present address: Michigan State University Cell and Molecular Biology Program, East Lansing, Michigan 48824, USA. * These authors contributed equally to this work. ** These authors jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.M. (email: mireille.montcouquiol@inserm.fr).

Chudley-McCullough syndrome (CMCS, OMIM 604213) is a rare autosomal recessive neurological disorder in humans, characterized by early and severe onset of sensorineural deafness and hypoplasia of the corpus callosum (CC)¹. CMCS syndrome patients often display frontal polymicrogyria (excessive small folds in the cortex of the brain) and heterotopia. These may be associated with cerebellar dysplasia, arachnoid cysts and ventriculomegaly. Some degree of delayed mental development has been reported for some patients, as well as occasional seizures, with overall psychomotor development generally normal². The reason for this pleiotropy is not known and neither is the molecular basis of the pathology.

Recently, mutations in G-protein signalling modulator 2 (*GPSM2* in humans, also known as Leu-Gly-Asn repeat-enriched protein (*LGN*), mammalian Partner of inscuteable (*mPins*) or *Gpsm2* in mammals) were found to cause CMCS^{2–4}. Because of the well-known role for *Gpsm2* in the control of spindle position during orientated division⁵, it was suggested that CMCS might result from defects in asymmetric division of progenitors, both in the inner ear and the brain². Recently, we demonstrated that *Gpsm2* and one of its binding partner, the α -subunit of the heterotrimeric G-protein G_{i3} ($G\alpha_{i3}$ encoded by *Gnai3*), control the asymmetric localization of the kinocilium in developing postmitotic hair cells (HCs) of the mammalian cochlea^{6,7}. These results were confirmed by another group that also reported an accumulation of both proteins at the tip of the hair bundles of the HCs^{8,9}.

A HC stereocilia bundle is an actin-rich organelle consisting of a specialized array of microvilli-derived structures that protrude from the apex of auditory and vestibular HCs. Mechanical deflection of the hair bundle gates mechano-sensitive ion channels in stereocilia that leads ultimately to afferent action potentials being conveyed to the central nervous system. Proper development and maintenance of stereocilia are vital for normal hearing¹⁰. Mechanisms that control HC bundle length are not fully understood. During early postnatal development, actin monomers are added at the barbed (plus) end of the stereocilium, resulting in elongation from the tip^{11–13}. Several proteins are known to control this process^{14,15}, with one common property being their localization at the tips of stereocilia during elongation¹⁶. The scaffold protein whirlin (encoded by *Whrn*) and myosin 15 (encoded by *Myo15*) are two of the best-characterized proteins among the HC bundle proteome participating in stereociliary growth. Myosin 15 interacts with whirlin and traffics it to the stereocilia tips where they colocalize with the actin-bundling and capping protein Eps8 (epidermal growth factor receptor pathway substrate 8)^{17–19}, also dependant on myosin 15 for its localization at the stereociliary tip. Defects in all three genes individually cause abnormally short stereocilia^{19–22}, deafness in mice^{19,21,23} and non-syndromic human deafness^{24–26}.

In this study, we show that *Gpsm2* and $G\alpha_{i3}$ define an ~ 200 nm domain at the tip of stereocilia, and that conditional deletion of either gene prevents stereocilia elongation, the likely cause of the early deafness and hearing deficits observed in mutant mice. Furthermore, we demonstrate that mutations identified in CMCS patients affect protein complexes, including a novel and functionally relevant interaction between *Gpsm2* and whirlin. Using live super-resolution imaging, we show that actin dynamics are disrupted in growth cones of young hippocampal neurons from *Gpsm2* mutant mice, affecting neuronal outgrowth. These data support the idea of a global function for *Gpsm2* in modulating actin dynamics. The versatility of *Gpsm2*/ $G\alpha_{i3}$ roles on actin and tubulin, in proliferative and postmitotic cells, is the probable cause of pleiotropy in CMCS brain anomalies.

Results

***Gpsm2* and $G\alpha_{i3}$ define a tip nanodomain within stereocilia.** We evaluated the localization of *Gpsm2* and $G\alpha_{i3}$ during the development of stereocilia hair bundles using previously characterized specific antibodies⁶. *Gpsm2* was localized at the tip of the nascent hair bundle at embryonic day 17.5 (E17.5), the earliest phase of its formation (Fig. 1a, yellow arrows). Consistent with previous observations, the apical crescent-shaped accumulation of *Gpsm2* was also present (Fig. 1a, stars; refs 6,8). By postnatal day 7 (P7), when stereocilia are rapidly elongating, *Gpsm2* and $G\alpha_{i3}$ were enriched at the tips of the tallest row of inner hair cell (IHC) stereocilia, the actual sensory receptors receiving 95% of the fibres of the auditory nerve that project to the brain (Fig. 1b,c), but also in vestibular HCs of the ampulla (Fig. 1d). At P15, the enrichment is maintained in the tallest row, whereas we could not detect fluorescence in the middle and small rows (Fig. 1e,f). At this stage, the apical crescent-shaped staining became fragmented or absent, suggesting a gradual loss of these proteins from this zone. Multicolour STimulated Emission Depletion (STED) nanoscopy was used to probe the stereocilia tip compartment and revealed that *Gpsm2* was concentrated into a circular cap-like structure (Fig. 1f–h), similar to what was described for myosin 15 (refs 12,17,27), above the actin core labelled with phalloidin. Multicolour STED revealed that both *Gpsm2* and Eps8 domains mostly overlapped (Fig. 1i). To evaluate the size of the tip domain, we mechanically isolated stereocilia after immunocytochemistry, to obtain perfectly flat structures (Fig. 1j,k). Using fluorescence intensity line-scans along individual long stereocilia labelled with *Gpsm2* and Eps8 antibodies and using the full-width at half-maximum (FWHM), we estimated that the tip domain extended ~ 200 nm axially at the stereocilia tip (*Gpsm2* FWHM = 198 ± 59 nm, $n = 10$; Eps8 FWHM = 200 ± 63 nm, $n = 10$). These results reveal a narrow stereocilia tip compartment of ~ 200 nm where actin filament polymerization is regulated during hair bundle development.

Loss of *Gpsm2* or $G\alpha_{i3}$ blocks stereocilia elongation. Owing to their localization at the site of actin polymerization, we hypothesized that *Gpsm2* and $G\alpha_{i3}$ might be molecular components required for the developmental elongation of stereocilia. To test this, we examined the cochlear sensory epithelium of conditional mutant mice generated with a Foxg1-Cre driver (hereafter, named *Gpsm2* cKO and *Gnai3* cKO), during critical stages of stereocilia elongation. At P5, in early phases of elongation, scanning electron microscopy (SEM) analyses revealed an $\sim 40\%$ decrease in IHC tallest stereocilia length in *Gpsm2* cKOs (see Methods) and $\sim 25\%$ decrease in *Gnai3* cKOs, compared with controls (Fig. 2a–d). There was also a statistically significant increase in the number of stereocilia per bundle in IHCs of *Gpsm2* cKOs (by $\sim 25\%$) and *Gnai3* cKOs (by $\sim 15\%$), with abnormal supernumerary (more than three) rows of short stereocilia compared with control (Fig. 2e). Omnidirectional lateral links could be seen in both *Gpsm2* and *Gnai3* cKOs (magenta arrows and insets in Fig. 2b,c), similar to the phenotype reported for the myosin 15-deficient mutant mouse *shaker 2* (ref. 28) (*sh2*, *Myo15*^{sh2}). We conclude that *Gpsm2* and $G\alpha_{i3}$ are each required for the normal process of actin filament elongation that drives stereocilia development.

At P21, when elongation is completed, the average length of the tallest row of stereocilia was reduced by $\sim 70\%$ and 50% compared with controls in *Gpsm2* and *Gnai3* cKOs, respectively (Fig. 2f–i, Supplementary Fig. 1a). The phenotype was more severe in *Gpsm2* cKOs that have short, thick stereocilia. In *Gnai3* cKO, we sometimes observed normal size stereocilia among an overall shortened hair bundle (Fig. 2h, magenta brackets), notably

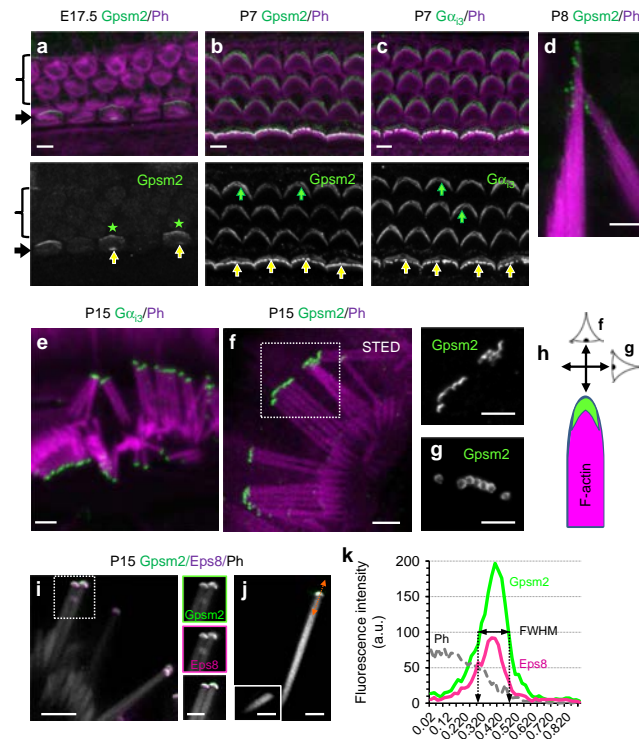


Figure 1 | Gpsm2 and $G\alpha_{13}$ are dynamically expressed at the tips of stereocilia. (a–c) Surface view of whole mounts of rat cochlear sensory epithelium at E17.5 (a) and P7 (b,c) illustrating Gpsm2 (a,b, green) and $G\alpha_{13}$ (c, green) labelling in the actin-rich hair bundle labelled by phalloidin (Ph, magenta). (a) At E17.5, Gpsm2 localizes at the tips of stereocilia at the onset of hair bundle growth (yellow arrows), but also in an asymmetrical crescent in a distal region of the apical membrane of HCs (green asterisks). (b,c) By P7, both proteins accumulate at tips of stereocilia (green), strongly in IHC (yellow arrows) and more weakly in OHC (green arrows). Arrow: inner hair cell (IHC). Bracket: outer hair cell. Scale bars (a–c), 4 μ m. (d) Gpsm2 (green) is localized at tips of P8 stereocilia of rat vestibular HC bundles. Ph: phalloidin. Scale bar, 2 μ m. (e) At P15, confocal imaging reveals the accumulation of $G\alpha_{13}$ protein at the tip of individual stereocilium. Scale bar 2 μ m. (f–h) At P15, STED super-resolution imaging of the Gpsm2-expression domain at an individual stereocilium tip (f). Gpsm2 accumulated at tips of IHC stereocilia (green), above the F-actin labelling (magenta). (f, right panel, g) Acquisition of single plane images in two perpendicular axes as illustrated on the schematic in h reveals the cap-like structure of the Gpsm2 nanodomain. Scale bars, 2 μ m. (i) Triple STED labelling reveals two mostly overlapping nanodomains at stereocilia tips with Gpsm2 (green) and Eps8 (magenta) above the F-actin signal (Ph, white). Left images: individual channels for Gpsm2 (top) and Eps8 (middle). The bottom image illustrates the phalloidin channel (grey) with two-colour binary representation of Gpsm2 (green) and Eps8 (magenta), with the overlapping domain (plain white). Scale bar, 2 μ m. (j) Isolated long (j) and short (j, inset) stereocilia illustrate the accumulation of the two proteins in the long stereocilium only. Scale bar, 1 μ m. (k) Intensity profiles of phalloidin, Gpsm2 and Eps8 from (j) (orange line across tip domain). Immunostainings repeated more than six times.

in the midbasal and more immature apical regions of the cochlea (Supplementary Fig. 1a, right panel, green arrows). In both cKOs, we observed supernumerary stereocilia per bundle, with ~60% and 50% increase in *Gpsm2* and *Gnai3* cKOs, respectively, as compared with controls (Fig. 2j). These phenotypes are similar to those reported for *Myo15*, *Whrn* and *Eps8* mutants^{20–22,29}. Our results show that IHC bundles in *Gpsm2* and *Gnai3* mutants share similar phenotypes, with stereocilia elongation significantly affected at the onset of hair bundle formation and an overall more severe phenotype in *Gpsm2* cKOs.

Owing to the well-documented role of Gpsm2 (Pins) on spindle orientation during asymmetric cell divisions, hearing loss in CMCS patients was proposed to result from a defect in planar cell polarity^{2–4}. Once apical/basal polarity has been established in mice, formation of the stereocilia bundle initiates in postmitotic

HCs in the basal part of the cochlea coil. The critical phase of stereocilia elongation required to form the mature hair bundle occurs mostly after birth (P0). To confirm a postmitotic role for Gpsm2 in hair bundle elongation, we generated *Gpsm2* conditional mutants using the *Pou4f3* promoter to drive Cre-mediated recombination in postmitotic HCs only³⁰ (Supplementary Fig. 1b). Hair bundles in these mutants displayed supernumerary rows of shorter stereocilia at P8 (Fig. 2k), similar to the phenotype we observed with an early embryonic deletion of the gene. To confirm a postmitotic function of $G\alpha_i$ in stereocilia elongation, we treated cochlear explants from newborn rats (P0/P1) for 8 days *in vitro* (DIV) with increasing concentrations of pertussis toxin (PTX), a pharmacological inhibitor of all three $G\alpha_i$ protein isoforms (Supplementary Fig. 1c). After 8 DIV, we found that stereocilia elongate in control cultures, whereas in the

presence of PTX, hair bundles of IHCs exhibited supernumerary rows of short stereocilia (Fig. 2l), similar to those observed for the *Gnai3* cKOs. In these PTX-treated samples, the average length of the tallest row of stereocilia was reduced by ~30% when compared with controls (Fig. 2m).

Loss of *Gpsm2* or *Gz13* causes hearing and balance deficits. We assessed the auditory function of *Gpsm2* and *Gnai3* cKOs by measuring the threshold of auditory brainstem responses (ABR) using click-tones and pure tone of frequencies from 1 to 45 kHz. *Gpsm2* cKOs were profoundly deaf at 6 weeks of age (Fig. 3a),

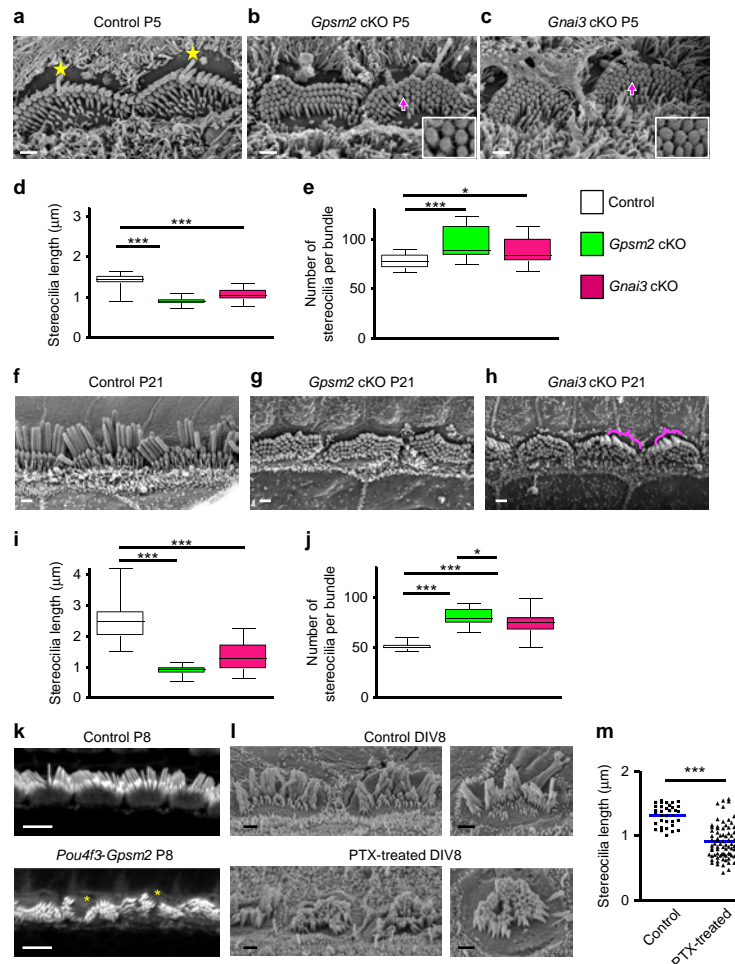


Figure 2 | *Gpsm2* and *Gnai3* mutations inhibit stereocilia elongation. (a–c) SEM of cochlear inner hair cells (IHC) from controls (a), *Gpsm2* (b) or *Gnai3* cKOs (c) in P5 mouse. The kinocilium is indicated with yellow stars. In *Gpsm2* (b) and *Gnai3* (c) cKOs, the staircase pattern is almost absent with stereocilia of similar length and width. Lateral links between adjacent stereocilia are preserved (magenta arrows, insets). Scale bars, 1 μm . (d,e) Quantifications at P5 show reduced length of IHC tallest stereocilia and supernumerary stereocilia in both *Gpsm2* and *Gnai3* cKOs. Quantifications are presented as whisker box plots (min/max), * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ with one-way ANOVA (post hoc Bonferroni's test). (f–h) SEM of basal cochlear IHC from controls (f), *Gpsm2* (g) or *Gnai3* cKOs (h) in P21 mouse. In *Gpsm2* cKOs, stereocilia are short, typically with more than four rows and severely reduced staircase pattern. A similar, but weaker phenotype was observed in *Gnai3* cKOs, with occasional longer stereocilia in a bundle with overall shorter stereocilia (h, magenta brackets). Scale bars, 1 μm . (i,j) Quantifications at P21 are consistent with the above illustrations with a severely reduced length of IHC stereocilia and supernumerary stereocilia in *Gpsm2* cKOs, and a similar but milder phenotype in *Gnai3* cKOs. Quantifications are presented as whisker box plots (min/max), * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ with one-way ANOVA (post hoc Bonferroni's test). (k) 3D rendering of the surface of a control (top) and a *Pou4f3-Gpsm2* mutant (bottom) at P8. Mutants exhibit supernumerary rows of abnormally short stereocilia, sometimes split or fragmented (yellow asterisks). Scale bars, 4 μm . (l) SEM of postnatal cochlear explants treated or not for 8 days (DIV8) with 100 ng ml^{-1} PTX. In the PTX-treated samples (bottom panels), the stereocilia are shorter than in controls (upper panels), with similar widths. Scale bars, 1 μm . (m) Quantification of the length of the tallest stereocilia cultures treated with PTX (blue line = mean). $n = 34$ (control) and 76 stereocilia (PTX). Cultures repeated three times. *** $P < 0.0001$ with unpaired Student's *t*-test.

with ABR thresholds above 90 decibel sound pressure level at all frequencies, whereas *Gnai3* cKOs displayed specifically high frequency hearing loss starting at 11.3 kHz at the same age (Fig. 3b). These results are consistent with the differences in the severity of the phenotype we observed morphologically, and demonstrate that *Gpsm2* and $G\alpha_{13}$ are essential for stereocilia maturation and hearing. Another *Gpsm2* cKO resulting in a truncated protein lacking the carboxy terminus was recently

reported to be deaf³¹. Also, *Gpsm2*, but not *Gnai3* cKOs, exhibited increased hyperactive behaviour (413%) from controls and circling behaviour (>130 rotations in cKO) (Fig. 3c–f). *Gpsm2* cKOs swam in tight circles and are more mobile than their control littermates in a forced swim test (Fig. 3g). These results are indicative of a vestibular dysfunction and are consistent with the shortened stereocilia observed in the vestibular epithelium of the *Gpsm2* cKOs (Fig. 3h).

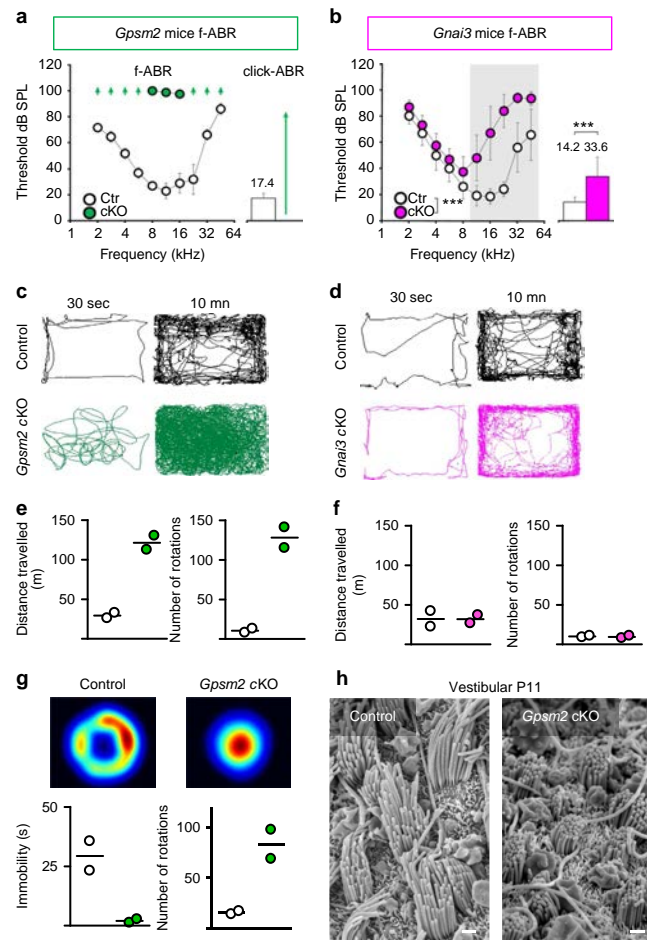


Figure 3 | *Gpsm2* and *Gnai3* mutations affect cochlear and vestibular function. (a,b) Hearing tests on 4-week-old mice reveal severe threshold increases in *Gpsm2* cKO (a), compared with high frequency loss only in *Gnai3* cKOs (b). Arrow in a indicates ABR thresholds exceeding the maximum testable intensity. Mean \pm s.d. click-evoked ABR (click-ABR) and tone-burst-evoked ABR (f-ABR). Mean threshold values (in dB SPL) of click-ABR of control mice are shown above corresponding bars. *** $P < 0.001$ (Grey shaded area: $P < 0.05$) by two-way ANOVA (post hoc Bonferroni's multi comparisons test). f-ABR: Control (Ctr) and cKO, $n = 8$ ears from eight mice click-ABR; Control and cKOs: $n = 16$ ears from eight mice. (c,d) Left panel: *Gpsm2* cKOs (green traces) display increased circling activity in a representative open-field during the first 30 s and at the end of the track (10 min) compared with control littermates, whereas *Gnai3* cKOs (magenta traces) are unaffected (right panel). (e,f) *Gpsm2* cKOs mice cover more distance and rotate more than *Gnai3* cKOs mice (each circle is an individual mouse). Open white circles are controls. (g) Top: heat map of force swim test occupancy for control and *Gpsm2* cKOs. Bottom: during the 2 min test, *Gpsm2* cKO mice showed less immobility and more body axis rotation compared with controls. (h) SEM of the surface view of the macula of the utricle of P11 mice in control (left) and *Gpsm2* cKO (right). Stereocilia elongation in the mutant is dramatically reduced compared with control. Scale bars, 1 μ m.

Gpsm2/G α_{13} need myosin 15/whirlin for stereocilia elongation. Since *Gpsm2* and *Gnai3* mutants have short stereocilia similar to *shaker 2* (*sh2*; myosin 15 functional null) and *whirler* (*wi*) mutants, we hypothesized that these proteins form a larger macromolecular complex. The delivery of whirlin to stereocilia tips requires functional myosin 15, whereas trafficking of myosin 15 can occur independently of whirlin¹⁷. We found that *Gpsm2* (Fig. 4a,b) and *G α_{13}* (Fig. 4c,d) were both absent from the stereocilia tips of *sh2/sh2* (Fig. 4a,c) and *wi/wi* HCs at P8 (Fig. 4b,d). These data demonstrate that *Gpsm2* and *G α_{13}* require

myosin 15 to be trafficked to the tips of stereocilia. Myosin 15 was still present at the tip of short stereocilia of *Gpsm2* and *Gnai3* cKOs at P8 (Fig. 4e,f), whereas whirlin localization was absent in *Gpsm2* and *Gnai3* cKOs (Fig. 4g,h). Importantly, in earlier stages (P4) we observed that the apical crescent of *Gpsm2* and *G α_{13}* was maintained in *sh2/sh2* mice (Fig. 5a,b). This result demonstrates that both proteins depend upon different interactions and protein complexes for apical membrane or stereocilia tip traffic within the HC. We also confirmed that the localization of both proteins at the tips of stereocilia was interdependent (Fig. 5c,d) as is the case

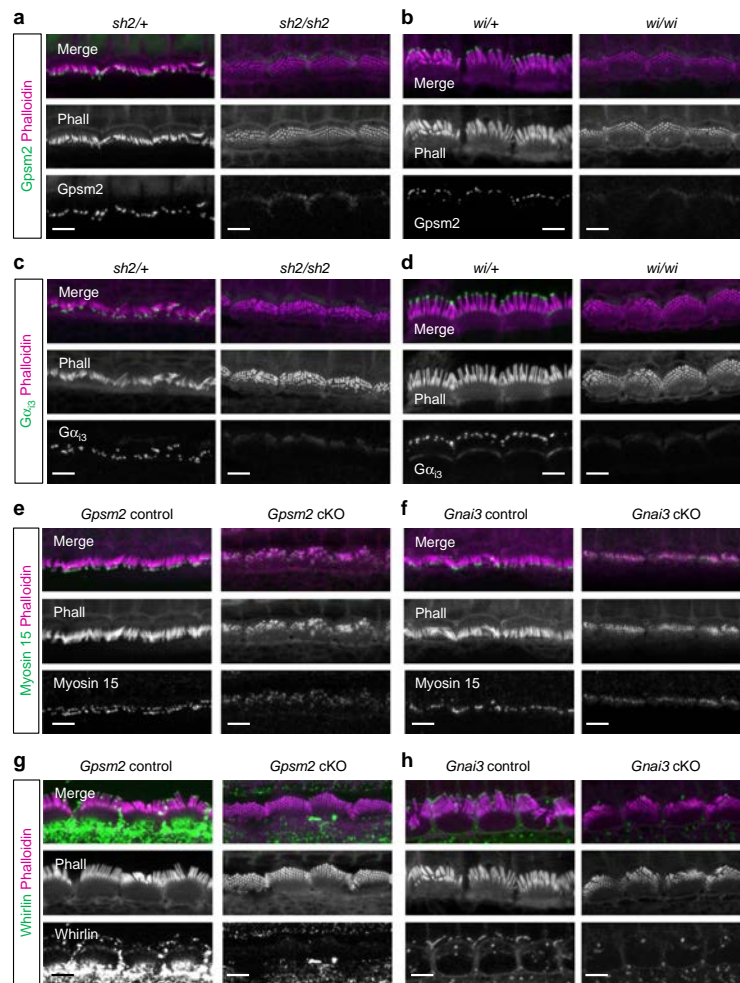


Figure 4 | Gpsm2 and G α_{13} localization at stereocilia tips is dependent on myosin 15 and whirlin. (a–d) Immunocytochemistry for *Gpsm2* (a,b) or *G α_{13}* (c,d) and staining with phalloidin (Ph, magenta) shows protein localization at the tips of stereocilia in IHCs from *shaker 2* (*sh2*/+, a,c) and *whirler* (*wi*/+, b,d) control mice at P8. Homozygous mutations (*sh2/sh2* and *wi/wi*) lead to a loss of *Gpsm2* and *G α_{13}* stereocilia tip staining. The immunostainings were repeated four times. (e,f) Immunocytochemistry for myosin 15 (green) and staining with phalloidin (Ph, magenta) shows protein localization at tips of stereocilia in IHCs from controls of *Gpsm2* (e) and *Gnai3* (f) cKO P8 mice. Myosin 15 protein is still present at the tip of shortened stereocilia of both cKOs, though in reduced amounts. (g,h) Immunocytochemistry for whirlin (green) and staining with phalloidin (Ph, magenta) shows protein localization at tips of stereocilia in IHCs from controls of *Gpsm2* (g) and *Gnai3* (h) P8 mutant mice. *Gpsm2* and *Gnai3* mutation leads to a strong reduction of whirlin stereocilia staining. Scale bars, 4 μ m. The immunostainings (e–h) were repeated six times and imaged blindly.

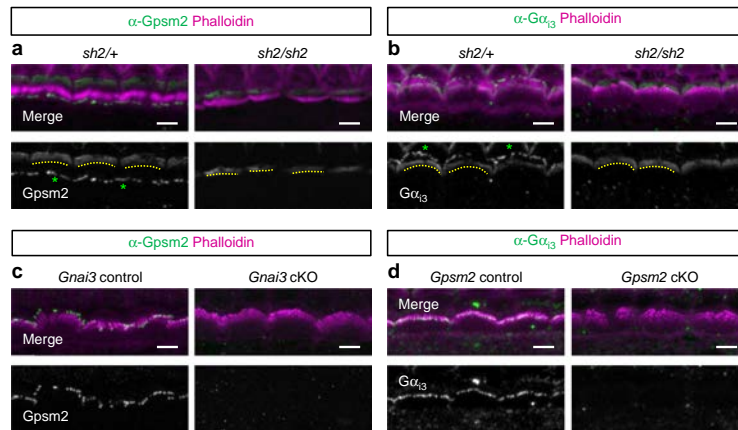


Figure 5 | Gpsm2 and $G\alpha_{13}$ depend upon myosin 15 to reach stereocilia tips but not for their targeting at HC apical membrane. (a,b) Immunocytochemistry for Gpsm2 (a) or $G\alpha_{13}$ (b) shows both protein localization at the tips of stereocilia (green asterisks), and at the apical membrane of HC as a crescent-shape (yellow dashed-line) from controls of *shaker 2* (*sh2/+*). Homozygous mutation (*sh2/sh2*) leads to a loss of Gpsm2 and $G\alpha_{13}$ stereocilia tip staining, whereas the apical crescent is maintained. (c) Immunocytochemistry for Gpsm2 (green) shows protein localization at the tips of stereocilia in IHCs from controls of *Gnai3*, but absent from *Gnai3* cKO. (d) Reciprocally, immunocytochemistry for $G\alpha_{13}$ (green) shows protein localization at the tips of stereocilia in IHCs from controls of *Gpsm2*, but absent from *Gpsm2* cKO. Scale bars, 4 μ m. The immunostainings were repeated four times.

in many other systems^{32,33}. Altogether, our data demonstrate that Gpsm2 and $G\alpha_{13}$ are sorted to the apical membrane and to the stereocilia tip via different protein interactions.

Our data suggest that whirlin is necessary for the trafficking and/or the maintenance of Gpsm2 and $G\alpha_{13}$ at the tip of the stereocilia, and absence of whirlin in *Gpsm2/Gnai3* cKOs also suggest that the protein module participates in whirlin maintenance at the stereocilia tips. Altogether, our data show that the similar phenotypes of *sh2*, *wi*, *Gpsm2*, *Gnai3* mutant mice arise from a common molecular function in driving stereocilia elongation.

Gpsm2 and whirlin interact. To further explore the functional interactions between myosin 15, whirlin, Gpsm2 and $G\alpha_{13}$ proteins, we used a heterologous system. COS-7 cells co-transfected with complementary DNA (cDNA) constructs encoding both myosin 15 and whirlin result in numerous actin-rich filopodia protrusions and the two proteins accumulate at the tips of those extensions¹⁷. Using this system, we show that Gpsm2 and $G\alpha_{13}$ were also transported to the tip of the filopodia in the presence of myosin 15 and whirlin (Fig. 6a,b). The majority of filopodia tips (99%) contained Gpsm2 in the presence of whirlin and myosin 15, and this number drops to 6% when an empty vector coding for DsRed replaces DsRed-whirlin (Fig. 6c). Co-immunoprecipitation experiments confirmed an interaction between full-length myc-tagged Gpsm2^{FL} and either green fluorescent protein (GFP)-whirlin or untagged whirlin, whereas non-immune IgG or pEGFP-C3 coding for GFP did not co-immunoprecipitate either myc-Gpsm2 nor whirlin demonstrating the specificity of the interaction (Fig. 6d,e, Supplementary Fig. 2a,b). To assess the interaction in the context of CMCS, we evaluated a human *GPSM2* variant reported in patients that is predicted to truncate the GoLoco and linker domains, and is associated with multiple and severe anatomical brain abnormalities². The Gpsm2^{R318RfsX8} variant still bound to whirlin, indicating that the N-terminal domain of

Gpsm2 was sufficient for this interaction (Fig. 6d,f). We used glutathione S-transferase (GST)-pull down assays to show that the unstructured C-terminal region of whirlin, between aa 672 and aa 810 was the minimal domain required to interact with Gpsm2^{R318RfsX8} (Fig. 6d,g). All of the whirlin GST-constructs lacking this region failed to interact with myc-Gpsm2^{R318RfsX8}, whereas the three GST-constructs containing this region pulled down the variant (Fig. 6g, lanes 4, 6, 8). To test if Gpsm2^{FL} may act as an adapter stabilising whirlin at the tips of stereocilia, we transfected HEK293T cells with increasing amounts of myc-Gpsm2^{FL}-encoding cDNA while maintaining the quantity of DsRed-whirlin cDNA constant. Under these conditions, we observed a net increase in DsRed-whirlin protein expression levels, whereas increasing doses of DsRed-whirlin had no significant reciprocal effect on myc-Gpsm2 levels (Fig. 6h,i). Controls with increasing amount of cDNA encoding myc-Gpsm2^{FL} did not affect DsRed levels (Supplementary Fig. 2c). One possible interpretation of these results is that when in a complex with Gpsm2, whirlin protein may be stabilized, possibly by being less susceptible to degradation.

As Gpsm2^{R318RfsX8} still bound whirlin, we evaluated if it could modulate the ability of myosin 15 and whirlin to generate filopodia. Figure 6d illustrates the position of GPSM2 truncating variants identified in CMCS patients and the resulting predicted truncated proteins. In the presence of myc-Gpsm2^{FL}, 42% of COS-7 cells extended filopodia, whereas in the presence of Gpsm2^{R318RfsX8}, this number was reduced by half to 21% (Supplementary Fig. 2d, see Methods). These results suggest that the truncation of the linker and GoLoco domains in Gpsm2^{R318RfsX8} impairs the filopodia-generating ability of the myosin 15/whirlin complex. To evaluate if some of these truncation mutations could affect the proteins levels, we quantified immunoblots of the different Gpsm2 variants. Results show that the myc-Gpsm2^{Q562X} variant (missing the last two GoLoco domains) had an $\sim 15 \pm 4\%$ reduction in protein levels compared with the myc-Gpsm2^{FL}, whereas myc-Gpsm2^{P.G491GfsX6} variant (missing all four GoLoco domains) led to an $\sim 70 \pm 4\%$

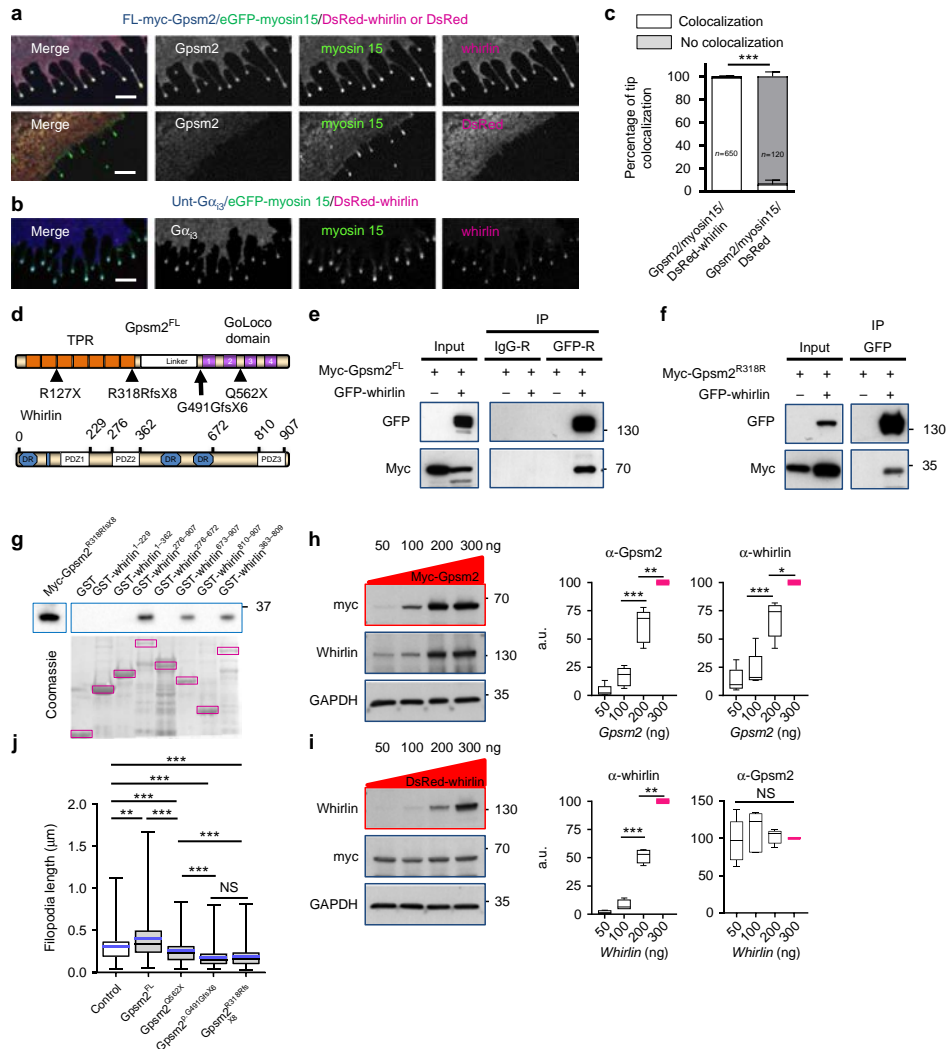


Figure 6 | New protein complex between Gpsm2 and whirlin. (a-c) COS-7 cells transiently transfected with GFP-Myo15, DsRed-whirlin, myc-Gpsm2^{FL}, untagged G α_3 or DsRed as indicated. (a) Co-expression of myosin 15 and whirlin leads to the formation of actin-rich filopodial structures with Gpsm2 accumulating at the tip with the two proteins. Absence of whirlin (DsRed only) markedly reduces the colocalization at the tips. (b) G α_3 also accumulates at the tip of filopodia with myosin 15 and whirlin. Transfections were repeated more than three times. Scale bars, 4 μm . (c) Percentage of filopodia tips (\pm s.e.m.) displaying colocalization of Gpsm2, myosin 15 and whirlin in the two contexts. n = number of filopodia tips from three independent experiments. *** P < 0.001 with Mann-Whitney test. (d) Schematic representation of Gpsm2^{FL} and whirlin proteins. Four variants identified in CMCS patients, including Gpsm2^{R318RfsX8} are indicated. (e) Whirlin co-immunoprecipitates with myc-Gpsm2^{FL} but not with non-immune IgG. (f) The interaction is maintained, though reduced, with the Gpsm2^{R318RfsX8} (Gpsm2^{R318R}) variant. Representative images of $n > 3$ independent experiments. (g) A GST-pull-down assay indicates that the unstructured region of whirlin between aa 672 and aa 810 binds to Gpsm2^{R318RfsX8}. Representative image of $n = 3$ independent experiments. (h,i) Increasing amounts of myc-Gpsm2^{FL}-encoding cDNA over constant amounts of whirlin leads to a net increase in whirlin expression levels, whereas increasing doses of whirlin had no significant effect on Gpsm2 levels. Five independent experiments presented as whisker box plots (min/max) combined with dot plot (blue bars representing the mean values) *** P < 0.001, ** P < 0.01, * P < 0.05 (for h,i) with one simple t -test or one-way ANOVA (post-hoc Bonferroni's test). NS, not significant. (j) Gpsm2^{FL} significantly increased the length of filopodia generated by eGFP-myosin 15 and DsRed-whirlin (control) in COS-7 cells. Constructs bearing CMCS mutations led to shorter filopodia, compared with control or to Gpsm2^{FL}. Data are presented as whisker box plots (min/max) from three independent experiments ($n = 220, 207, 345, 228$ and 188 filopodia, in the order indicated on the histogram's x axis) (blue bars represent the mean values). *** P < 0.001, ** P < 0.01 with Kruskal-Wallis test (post-hoc Dunn's Multiple Comparison Test). NS, not significant.

decrease, and the Gpsm2^{R318RfsX8} variant (missing all four GoLoco domains and the linker domain) led to $\sim 60 \pm 4\%$ decrease (Supplementary Fig. 2e). The shortest truncation (Gpsm2^{R127X}), with only two tetratricopeptide repeats domains remaining, was the most severe (too weak for quantification). The impact of three of these four truncations was evaluated upon filopodia length in the presence of myosin 15 and whirlin. We first noted that co-expressing Gpsm2^{FL} with myosin 15 and whirlin statistically increased the average length of filopodia (Fig. 6j). This increase was lost with all of the Gpsm2 variants tested. The truncated proteins also affected the myosin 15/whirlin effect, suggesting a dominant-negative effect. Notably, the shortest truncations retaining a amino-terminus (Gpsm2^{p.G491GfsX6}, Gpsm2^{R318RfsX8}) had the most severe effect on myosin 15/whirlin elongation. Taken together these data show that truncation mutations lead to some reduction in Gpsm2 protein levels, but they also indicate that the shortest forms still harbouring a N-terminus are able to interact with whirlin, therefore affecting the ability of myosin 15 and whirlin to induce filopodia elongation. We conclude that Gpsm2 is a new binding partner of whirlin, and that CMCS mutations affect the ability of the myosin 15/whirlin complex to generate filopodia.

Gpsm2 mutation affects neuronal development and motility.

In addition to early-onset sensorineural deafness, patients with CMCS also display specific brain malformations on magnetic resonance images; hypoplasia of the CC being a hallmark of this pathology¹. To evaluate the impact of Gpsm2 on CC development, we generated *Emx1-Cre*⁺Gpsm2 cKOs (Gpsm2^{Emx1}), deleting *Gpsm2* in the early and dorsal telencephalon. Analysis of brains from these cKOs confirmed the existence of a caudal CC agenesis (Fig. 7a), as reported in CMCS patients. CC defects can result from a disruption in neuronal progenitors or defects in axonal elongation and guidance, which are dependent upon the microtubule and actin cytoskeleton³⁴. Neurite elongation is due to the motility of the growth cone driven in part by protrusive forces generated by actin polymerization at the leading edge^{34,35} and the existence of a retrograde flow of actin resulting from a balance of filament polymerization and depolymerization, among other factors^{36,37}. We therefore hypothesized that actin dynamics could be impaired in mutant *Gpsm2* neurons and affect outgrowth. Measures of growth cone locomotion on N-cadherin-coated substrates showed that outgrowth of *Gpsm2* cKOs neurons was reduced by 37% compared with controls (control $0.97 \pm 0.04 \mu\text{m min}^{-1}$ versus cKO $0.61 \pm 0.02 \mu\text{m min}^{-1}$), whereas the speed of growth cones from *Gnai3* cKOs was indistinguishable from controls (control $0.92 \pm 0.02 \mu\text{m min}^{-1}$; cKO $0.89 \pm 0.02 \mu\text{m min}^{-1}$) (Fig. 7b). This *Gpsm2* cKO phenotype was also observed on a laminin-coated substrate, suggesting that the outgrowth reduction was not specific to an N-cadherin substrate (Fig. 7c). The number of pauses the growth cone made during the 30 min time-lapses on N-cadherin substrate was increased in *Gpsm2* cKO neurons (Fig. 7d–f, Supplementary Movie 1).

To evaluate whether Gpsm2 regulates actin cytoskeleton dynamics we monitored the behaviour of individual actin-mEOS2 molecules using Single Particle Tracking combined with Photo-Activation Localization Microscopy (sptPALM) under Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) illumination, in the peripheral region of the growth cones (see Methods, Fig. 8a,b). We recorded trajectories longer than seven frames (median of nine frames, Fig. 8c), and fit the mean squared displacement (MSD) using a power function of time with exponent α (values between 0 and 2). This parameter reflects the curvature of the MSD function and the type of movement of actin-mEOS2

molecules, with α values close to 2 representing more directed trajectories, and α values close to 0 representing more static molecules (illustrated Fig. 8d). Comparisons analysis of the distribution of exponent alpha for control and *Gpsm2* cKO shows statistical differences in the most extreme α values (below 0.6 and above 1.4; Fig. 8e). This demonstrates that actin-mEOS2 exhibit different dynamical behaviour in the peripheral region of growth cones of control and *Gpsm2* cKOs. These results, together with the reduced neuronal outgrowth in *Gpsm2* cKO, suggest that Gpsm2 affects motility of the growth cone through a modulation of actin dynamics.

The retrograde flow of actin is a complex phenomenon that is the result of many individual mechanisms, including actin filament nucleation and polymerization, capping and depolymerization, in addition to mechanical forces experienced from myosin contractility and coupling to adhesion molecules. Although we do not know the molecular complex that could drive Gpsm2 control of growth cone motility, we were able to co-immunoprecipitate (co-IP) endogenous whirlin with Gpsm2 from hippocampi lysates (Fig. 8f). We also found that co-expression of myc-Gpsm2 with DsRed-whirlin and GFP-myosin 15 in young (DIV3) hippocampal neurons lead to a striking colocalization of the three proteins at the tips of filopodia, supporting a role for these proteins in young neurons motility (Fig. 8g). To test if Gpsm2 could modulate actin polymerization, we compared the ratio of F-actin with G-actin (F/G) in cells transfected with both *Gpsm2* and *Gnai3* constructs. When co-expressed, the proteins significantly increased the F/G-actin ratio by 138% (2.4 ± 0.2) compared with the control, demonstrating its impact on actin polymerization (Fig. 8h). The Gpsm2^{R318RfsX8} variant of the protein resulted in a statistically significant reduction of this activation (1.6 ± 0.1). A similar assay performed on cultured cortical neurons (see Methods), resulted in a 32% decrease in F/G-actin ratio in *Gpsm2* cKO neurons compared with controls (0.68 ± 0.05) (Fig. 8i). These data support the hypothesis that Gpsm2 (with $G\alpha_{i3}$) stimulates actin dynamics in neurons, and that some of the brain anomalies observed in patients, notably CC hypoplasia, could be related to a disruption of Gpsm2-dependant actin-based mechanisms.

Discussion

In this study we show that the Gpsm2/ $G\alpha_{i3}$ module regulates actin polymerization during stereocilia elongation, and that a pathogenic mutation of either gene leads to abnormally short stereocilia, the likely cause of hearing loss in CMCS patients. We demonstrate that this function is due to a newly identified interaction between Gpsm2 and whirlin, a member of the stereocilia tip complex. Also, we show that a *Gpsm2* mutation affects CC formation and modulates neuronal outgrowth via the regulation of actin dynamics, supporting a global role for Gpsm2 in controlling the actin cytoskeleton.

Myosin 15 is the molecular motor responsible for delivering whirlin and Eps8 to the tips of actin-rich stereocilia and this ternary complex is required for elongation of nascent stereocilia. Our results show that myosin 15 and whirlin are also required for trafficking Gpsm2 and $G\alpha_{i3}$, two new members of the stereocilia tip complex, an electron-dense structure believed to contain proteins that regulate actin polymerization (Fig. 9). Accordingly, when myosin 15 is non-functional, Gpsm2 and $G\alpha_{i3}$ (this study), as well as whirlin¹⁷ and Eps8 (refs 19,22) are all absent from the stereocilia tips. On the other hand, when *Whrn*, *Gpsm2* or *Gnai3* are mutated, myosin 15 still accumulates at the tips of short abnormal stereocilia. The failure of *Whrn*, *Gpsm2* and *Gnai3* cKOs stereocilia to elongate despite the localization of myosin 15, suggests that these proteins assemble in a macromolecular

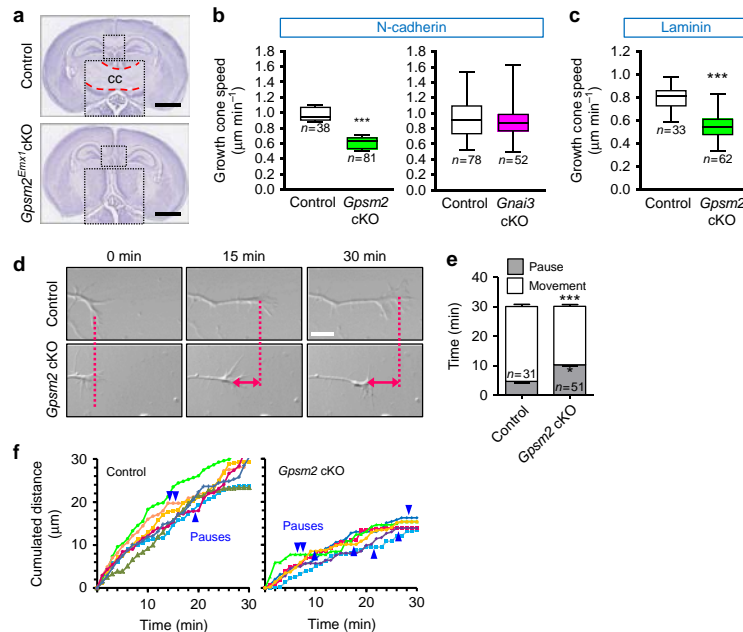


Figure 7 | *Gpsm2* mutation leads to hypoplasia of the corpus callosum and affects growth cone outgrowth. (a) Hematoxylin staining of coronal sections from P6 *Gpsm2^{Emx1}* control (upper panel) and cKO brains (lower panel) at caudal levels. Note the absence of corpus callosum (CC) in the cKO mouse (inset). Scale bar, 1 mm, $n = 4$ independent experiments. (b,c) In cultured hippocampal neurons at DIV2, N-cadherin-dependent outgrowth was reduced in *Gpsm2* cKOs, but not in *Gnai3* cKOs (b). The reduction in outgrowth was maintained on a laminin substrate in *Gpsm2* cKOs (c). Data from three to six independent experiments are presented as whisker box plots (min/max) ($n =$ number of growth cones). *** $P < 0.001$ with unpaired Student's t -test. (d) Images from three time points (0, 15 and 30 min) of a time-lapse movie from 2 DIV control and *Gpsm2* cKO hippocampal neurons plated on N-cadherin-coated glass and showing the difference in distance covered (dotted lines and double-headed arrows). Scale bar = 10 μm . (e) Quantification of the average number of pauses (\pm s.e.m.) during a 30 min period of growth cones from control ($n = 31$ neurons) compared with *Gpsm2* cKO ($n = 51$ neurons), from four independent experiments. The *Gpsm2* cKO growth cones pause more than controls. *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ with unpaired Student's t -test. (f) Cumulated distance covered by control and *Gpsm2* cKO growth cones over a 30 min period. Some pauses are indicated with blue arrows.

complex (including Eps8) to regulate actin polymerization at the stereocilia tips. Interestingly, it was recently shown that the distribution of whirlin on the tallest row of stereocilia was dependent upon the isoform 2 of myosin 15 (short form)³⁸. It is therefore probable that *Gpsm2* and *G α_{13}* are part of a preferential complex with myosin 15 isoform 2 and whirlin.

Our data extend the complexity of the interactions occurring at stereocilia tips during differentiation of HCs and provide new perspectives for the molecular machinery controlling actin polymerization. This complexity is highlighted by the increasing number of proteins identified and accumulating at the tip complex in a domain of ~ 200 nm or less during stereocilia elongation (Fig. 9). In many cellular contexts, *Gpsm2* and *G α_{13}* are at the interface between actin and the membrane, acting as a link between the two^{39,40}. In stereocilia, *G α_{13} -GDP* could be tethered at the plasma membrane via its myristoyl and palmitate moieties, and bound to the C-terminal GoLoco motifs of *Gpsm2*. This would leave the tetratricopeptide repeats and linker region of *Gpsm2* free to bind to various proteins (such as whirlin) to anchor or stabilize them, that could in turn interact with actin or other actin-regulatory proteins⁴¹, including Eps8 (refs 19, 22).

Our results significantly extend a recent report from Tarchini *et al.*⁹, showing the localization of *Gpsm2* (LGN) and *G α_i* protein at the tips of P7 mouse HCs stereocilia, and reporting deafness

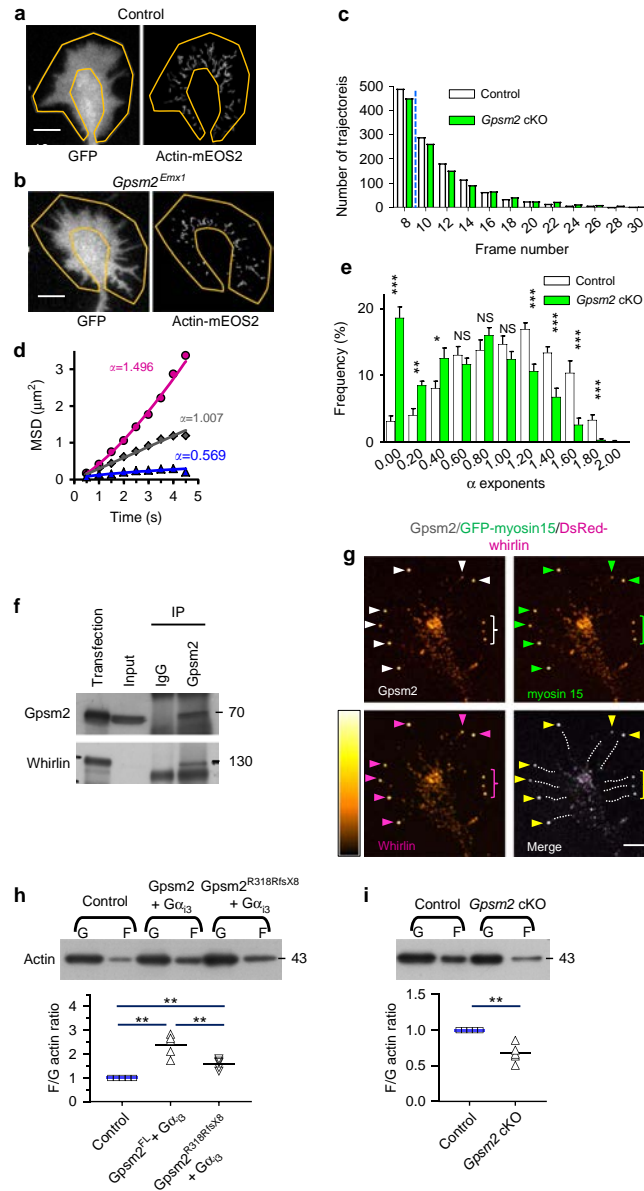
and shortened stereocilia in a *Gpsm2* mutant similar to ours. Importantly, we show that although myosin 15 is not required for the localization of *Gpsm2* to the apical membrane crescent reported previously^{6,8}, it is critical for the targeting of *Gpsm2*/*G α_{13}* to the stereocilia tip. This demonstrates that *Gpsm2* binds with different protein complexes to engage in distinct molecular mechanisms at these locations.

Based on our data, the early deafness observed in *Gpsm2* cKO would be a consequence of a lack of postnatal elongation of stereocilia in IHC, the auditory sensory cells that are responsible for signal transduction, and which receive the vast majority of afferent innervation. Our results also uncovered *G α_{13}* as a specific molecular partner for *Gpsm2* during stereocilia elongation, notably within the basal cochlear region, and as a candidate gene for early-onset progressive hereditary hearing loss. Some of the differences in hearing loss (earlier and comprising the entire tonotopic axis in *Gpsm2* mutants) probably reflect compensatory mechanisms by other *G α_i* isoforms⁴².

Our data support the hypothesis that a decrease in actin polymerization, maybe through a disruption of the actin retrograde flow, underlies the reduced motility of *Gpsm2* cKO neurons. In young postmitotic neurons there is an obvious molecular similarity between the mechanism controlling the elongation of the stereocilia, and those controlling the movements of the growth cone, including the existence of a filopodial tip

complex^{43–45} (Fig. 9). In both cases, it is the dynamic insertion of globular actin (G-actin) at the extremity of the structure (stereocilium or filopodium and lamellipodium) that allows elongation. This could be due to a role of Gpsm2 modulating the stability of the tip complex components, as we suggest for stereocilia elongation; a hypothesis supported by the endogenous co-IP of the Gpsm2 and whirlin from young hippocampi. All of

the proteins identified so far that participate in stereocilia elongation are also expressed in the brain of mammals, including Gpsm2, $G\alpha_{13}$, myosin 15, whirlin and Eps8 (refs 46–50) (this manuscript). Myosin 15 is related to unconventional myosin 10 (MYO10), a powerful inducer of filopodia formation and elongation in neurons and other cells. Myosin 10 is present at the filopodia tip in bright puncta and remains there as the



filopodia extend and retract^{51–53}. We find myosin 15 enriched in neuronal growth cones and most filopodia, and accumulating with whirlin and *Gpsm2* at filopodia tips when co-transfected into hippocampal neurons. Myosin 15 could have overlapping functions with myosin 10 in neuronal protrusions, through a protein complex similar to the tip complex identified in the inner ear. But it is also possible that other neuron-specific binding partners for *Gpsm2* participate in this process in neurons. Further studies are required to explore the exact molecular mechanism underlying this result.

Previous work with a *Gpsm2* mouse model resulting in a truncated protein lacking the C-terminus suggested that cortical

malformations in CMCS are due to abnormally localized apical progenitors, with no impact on neuronal production or forebrain thickness^{54,55}. The authors however did not report on the morphology of the CC. In our *Gpsm2* cKO, we confirmed an overall normal cortical development and thickness, but we observed a severe hypoplasia of the CC, which appears to phenocopy a short and thin CC reported in the Palestinian patient carrying the p.R127X mutation in *GPSM2* (refs 2,3). Our results demonstrating reduced neuronal outgrowth in *Gpsm2* cKO neurons offer a mechanistic explanation for CC hypoplasia. The diverse anomalies observed in CMCS patients can be understood in the context of three cellular phenomena: (1) the

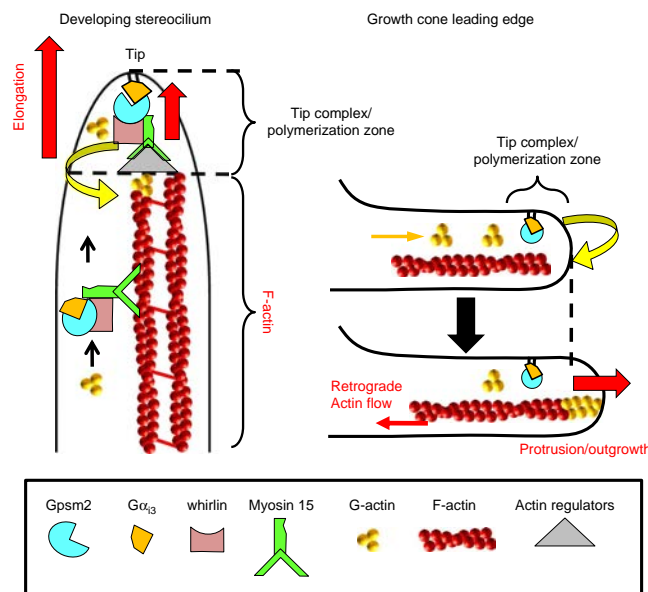


Figure 9 | *Gpsm2* mutations affect stereocilia elongation and neuronal outgrowth by regulating actin dynamics at tip complexes. Mechanistic model for *Gpsm2*-dependent stereocilia elongation and neuronal outgrowth. *Gpsm2* accumulates at the tip complex of both structures via the myosin 15 motor protein in stereocilia and a comparable motor protein in filopodia. *Gpsm2*-dependent macromolecular protein complexes modulate actin dynamics at the tip of stereocilia (growing end) or the leading edge of the growth cone, participating respectively in the elongation and motility of the two structures. See text for details.

Figure 8 | *Gpsm2* co-immunoprecipitates whirlin in brain lysates and increases actin polymerization. (a,b) Representative DIV2 growth cones from a control (a) and a *Gpsm2* cKO (b) with the outlined peripheral region where sptPALM data were collected (yellow) and the corresponding individual actin-mEOS2 trajectories (3 min recording). Note the overall more-confined behaviour of the actin molecules in the cKO. Scale bars, 5 μ m. (c) Distribution of the actin-mEOS2 trajectory length shows a median trajectory length of nine frames for both genotypes (blue line). (d) Representative mean squared displacement (MSD) over time for each of the three types of actin-mEOS2 behaviours with their corresponding α values. The plain curves represent fits to the function $MSD = 4Dt^\alpha$, where D is a diffusion coefficient and α is a power law exponent. (e) Repartition of the α values of actin-mEOS2 molecules in control and *Gpsm2* cKO neurons on N-cadherin substrate. Values from 11 (control) and 12 (cKO) growth cones from three separate experiments (\pm s.e.m., $n = 1344$ trajectories for control and 1121 for mutant). *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ with an unpaired Student's *t*-test or Mann-Whitney test when a normality test failed. NS, not significant. (f) Immunoprecipitation of *Gpsm2* together with whirlin using anti-*Gpsm2* serum. Membranes were immunoblotted with the antibodies indicated on the left. The experiment was replicated twice. (g) DIV3 hippocampal neurons electroporated with eGFP-myosin 15, DsRed-whirlin and myc-*Gpsm2* show enrichment of all three proteins at the tips of filopodia (arrowheads). Filopodia are outlined with dotted lines. The LUT was modified (left, Orange hot) to better visualise the accumulation. $n = 5$ independent experiments. Scale bar, 4 μ m. (h) Actin assay shows that the combination of *Gpsm2*^{Fl} and *Gα13* expression shift the F/G-actin ratio, whereas the *Gpsm2*^{R318RfsX8} mutation decreases this shift. Dot plot from five biological repeats (black bar represent mean values). ** $P < 0.01$ with Unpaired Student's *t*-test, ** $P < 0.01$ with one sample *t*-test. (i) Actin assays on cultures of neurons show a shift in the F/G-actin ratio, suggesting a decrease in actin polymerization in the *Gpsm2* cKOs. Dot plot from five biological repeats (black bar represent mean values). ** $P < 0.01$ with one sample *t*-test.

production and stability of the predicted truncated proteins, (2) the loss of GoLoco domains that are required for interaction with $G\alpha_i$, and (3) the loss or maintenance of domains that can impact on other binding partners of Gpsm2. This last point is illustrated here with results from the Gpsm2^{G491GfsX6} and Gpsm2^{R318RfsX8} variants whose expression leads to the production of truncated proteins with an almost complete N-terminus that is still able to bind to whirlin and affect the ability of myosin 15/whirlin to generate filopodia. Notably, compared with the shortest Gpsm2^{R127X} variant², the Gpsm2^{R318RfsX8} variant is associated with some of the most severe brain anomalies described so far, perhaps because the level of this truncated protein is barely detectable.

Recently, we showed that Gpsm2/ $G\alpha_{i3}$ regulates early planar cell polarity in inner ear epithelia by modulating tubulin dynamics in postmitotic cells in a mechanism reminiscent of those controlling oriented cell division⁶. Here, we show that the same complex controls actin dynamics not only in postmitotic HCs but also in neurons, through different binding partners. Because Gpsm2 has many interacting partners and is involved in microtubule and actin dynamics, in both dividing and postmitotic cells, each mutation identified in CMCS patients might affect a variety of mechanisms. The expression of Gpsm2 in both neurons and glia⁴⁴ adds another level of complexity to this, as the role of the protein in the latter has not been assessed. On the other hand, in the inner ear the deficits are very similar regardless of the mutation, with early-onset deafness identified in all patients, highlighting the absolute necessity of an intact Gpsm2 protein for hearing.

Altogether our study strongly suggests that the aetiology of CMCS, notably its complexity and multi-syndromic aspect, is due to the multifunctional role of the Gpsm2/ $G\alpha_{i3}$ module on actin and tubulin dynamics, in proliferative and postmitotic cells. This new molecular role for Gpsm2/ $G\alpha_{i3}$ in the regulation of actin dynamics in epithelial and neuronal tissues show that this protein complex plays sequential and/or partially overlapping roles in mechanisms controlling the polarized growth of tissues. Taken together, our work emphasizes the importance of identifying all interacting partners of Gpsm2 and $G\alpha_{i3}$ and the mechanisms associated with each interaction, in different (patho)physiological contexts.

Methods

Transgenic mice used in this study. All procedures involving animals were done in accordance to the European Communities Council Directives (2010/63/EU) and the French National Committee (2013-118) recommendations. The French 'Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche' approved all experiments under the authorisation no. APAFIS#1360-201508031720985 after agreement from the ethical committee of the University of Bordeaux. Gpsm2/*mPins* cKO was described previously⁶. Generation of conditional *Gnai3* KO mice. Exon 6 of the *Gnai3* gene was flanked by loxP-sequences, because in the global knockout mouse this exon was successfully deleted⁵⁶. For the positive selection of ES cell clones, a loxP-flanked TK-Neo resistance cassette was inserted in reverse orientation in intron 6 of the *Gnai3* gene at the 3' site. For negative selection a DTA cassette was inserted after exon 7. Subsequently, the loxP-flanked TK-Neo resistance cassette was deleted *in vitro*. Correctly targeted ES cell clones were identified and used for generation of chimeric mice, that is, SV129/C57BL/6 genetic background. After germ line transmission the mutant mice were backcrossed onto a C57BL/6 genetic background. In this study, *Gnai3* cKO were achieved by crossing $G\alpha_{i3}^{\text{fl/fl}}$ and *Foxg1-Cre* mice. *Shaker 2* (*Myo15* allele) and *whirlin* (*Whrn* allele) mutant mice were maintained at the NIDCD and all procedures were approved by the Animal Care and Use Committee (ACUC #1263-16). *Foxg1*^{tm1(Cre)Skm} (*Foxg1-Cre*) and *Emx1*^{B6.129S2-Emx1tm1(Cre)Krlj} (*Emx1-Cre*) stocks were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), USA. *Tg*^{(Pou4f3-cre)1Devel} mice was a gift from Douglas Vetter (Tufts University, Boston, MA, USA). B6.Cg-Gt(Rosa)26Sortm6(CAG-ZsGreen1)Hze/J (Ai6) mice were purchased from The Jackson Laboratory. All *Gpsm2* conditional knockout lines (cKO) were generated by crossing *Gpsm2* flox/flox animals⁶, whereas the *Gnai3* conditional knockout (*Gnai3* cKO) line was generated by crossing *Gnai3* flox/flox animals. The resulting *Gpsm2* cKO still expresses a short 147 amino-acid protein corresponding to the N-terminal of the Gpsm2^{F1}, whereas the *Gnai3* cKO is a

full conditional knockout. The recombination pattern in *Foxg1-Cre* mice closely matches the expression pattern of endogenous *Foxg1*. By E9.5/10.5 the expression of *Cre* is strongly driven in both the telencephalon and the entire otic vesicle/otocyst (early inner ear) of embryonic mice. Recombination occurs efficiently in both HCs and supporting cells in the cochlea (and vestibular system), and in most neurons of the telencephalon (glutamatergic and gabaergic), notably in the cortex and hippocampus^{57,58}. *Pou4f3* is expressed only in postmitotic HCs³⁰, and *Emx1* is expressed in the entire telencephalon as early as E10.5 (ref. 59). The *Cre* reporter mouse strain B6.Cg-Gt(Rosa)26Sortm6(CAG-ZsGreen1)Hze/J (Ai6), which induces the expression of ZsGreen from the Rosa26 locus, was used for evaluation of *Pou4f3-Cre*-induced recombination localization. Sprague Dawley Rats were obtained from Janvier (France).

Cochlear explants cultures and PTX treatment. For cochlear cultures, cochleae from P0/P1 rat are placed in culture and the next morning (12–16 h later) PTX was applied at 1–100 ng ml⁻¹, using a stock solution (50 µg ml⁻¹, Sigma) as reported previously described⁹. Half of the culture medium was changed every 2 days, and after 8 DIV the tissue were fixed before labelling with phalloidin fluorescein isothiocyanate (Sigma Aldrich) or processed for SEM.

Cochleae immunostaining. Inner ears from mice or rats were harvested at specific time points between P5 and P21. Up to P5 mice and rats were killed by decapitation, and in later stages, the animals were anaesthetized by CO₂ before decapitation. The inner ears were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde for 1.5–24 h at 4 °C for immunostaining. Fixed and dissected cochlear duct were processed for immunocytochemistry as previously described⁶. Some cochleae were mechanically scratched using forceps tips within the mounting medium to isolate stereocilia. The primary antibodies were as follow: anti- $G\alpha_{i3}$ (ref. 60 or Sigma G4040, 1:600), custom-made anti-Gpsm2 (ref. 6, pAb 1:500), anti-myosin 15 (PB48, ref. 50, pAb, 1:400), anti-whirlin (HLS136, ref. 17, pAb, 1:200), or anti-Eps8 (BD Transduction Laboratories, mAb, #610143, 1:200). Samples were incubated with primary antibodies for 1.5/2 h at room temperature (RT) to overnight (ON) at 4 °C with the primary antibodies, washed and secondary antibodies applied (anti-mouse or anti-rabbit conjugated with Alexa-488, -594 or ATTO647N (Life Technologies) for 1 h at RT. Phalloidin conjugated with fluorescein isothiocyanate (P5282 Sigma, 1:500) or TRITC (P1951 Sigma, 1:500) were added for 1 h at RT to label F-actin and thereby stereociliary hair bundles of HCs. When comparing staining between controls and knockout, the two cochleae were processed in the same tube at P5. For later stages, they were processed in different tubes as only a small piece can be dissected at this stage, which renders final identification difficult. The samples were placed in mounting medium (Prolong Gold antifade reagent, Life Technologies) and flattened with a glass coverslip under a microscope.

For image acquisition, we used a confocal/STED microscope (TCS SP8; Leica) with a module STED × 3. Imaging was done using a Z step from 0.25 to 0.35 µm. STED microscopy were performed with an objective 100 × 1.4 numerical aperture oil immersion STED objective. We used Atto 488 Phalloidin (Sigma, #49409, 1:600) with a depletion laser of 592 nm, goat anti-mouse Atto 647N (Sigma, #50185-1, 1:300) and goat anti-rabbit Alexa Fluor 594 with a depletion laser of 775 nm. Confocal images were processed in Velocity software (Perkin Elmer) and Adobe Photoshop or ImageJ.

SEM and measurements. The inner ear (cochlear and vestibular system) of mice aged P5 and P21 were harvested and immersed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.35, with 3 mM CaCl₂ for 24 h or more. The tissues were postfixed in 1% OsO₄ in the same buffer, dissected and double processed with thiocarbohydrazide followed by OsO₄ (ref. 61) before dehydration through an alcohol series and critical point drying with CO₂. After mounting on specimen support stubs, samples were sputter coated with platinum. Samples were examined with a JEOL 6700 F cold field emission scanning electron microscope operating at 3 or 5 kV. Measurements were made on the longest row of stereocilia closest to the kinocilium on 84 control stereocilia/16 HCs/2 mice and 75/24/2 (for P5 and P21), on *Gpsm2* cKO 36/8/2 and 108/21/2 (For P5 and P21), and on *Gnai3* cKO 95/18/2 and 60/14/2 (For P5 and P21) in at least four different cochleae. The quantification of the number of stereocilia were made on 23 control HCs/2 mice and 12/2 (for P5 and P21), on *Gpsm2* cKO 16/2 and 23/2 (for P5 and P21) and on *Gnai3* cKO 19/2 and 32/2 (for P5 and P21) in at least four different cochleae.

Images were collected from the basal or middle turn of the cochlea, defined as ~20/30% and 50/60% of the total length of the organ of Corti from the base. At each location, the hair bundles were viewed both from behind the longest row of stereocilia to view the height of the hair bundle as well as approximately perpendicular to the apical surface of the HC or toward the inner aspect of the bundle to examine its overall morphology and composition. To estimate bundle height, measurements were made from images at calibrated instrument magnifications of × 20,000 or occasionally × 10,000. Although we might have underestimated the actual stereocilia length, all efforts were taken to minimize the effect of parallax. Measurements were taken from bundles viewed from the lateral side toward the medial side (from the stria toward the modiolus), so that the row of longest stereocilia were imaged from the 'rear.' Samples were tilted and rotated so

that the row of longest stereocilia was approximately perpendicular to the direction of view. Stereo-imaging was used in a few cases to gain an indication of possible errors in length measurements from 2D images. From the anaglyphs generated by a pair of images separated by 8 degrees of tilt, height measurements were obtained using *analySIS* software. These revealed little difference in the height measurement from that obtained from the 2D image of a stereocilium at close to perpendicular to its long axis. Measurements were made using *ImageJ* software.

ABR and vestibular tests. ABR is measured by averaging the evoked electrical response recorded via subcutaneous electrodes. ABR to click and pure tone stimuli were recorded in anaesthetized mice aged 6 weeks. All physiological recordings were performed under anaesthesia (75 mg kg⁻¹ ketamin hydrochloride, Ketavet, Pharmacia, Pflizer, Karlsruhe Germany, 5 mg kg⁻¹ xylazin hydrochloride (Rompun 2%, Bayer Leverkusen, Germany), 0.2 mg kg⁻¹ atropine (Atropinsulfat B Braun, Melsungen, Germany) in a soundproof chamber (IAC, Niederkrüchten, Germany). In short, ABR thresholds were determined with click (100 µs), and pure tone stimuli (2–45.3 kHz, 3 ms duration).

For vestibular test, *Gpsm2* and *Gnai3* cKO mice and their control littermates (6 weeks old) were housed in a controlled environment (20–23 °C) with free access to food and water and maintained on a 12 h/12 h day/night cycle, light on at 7 am. Mice littermates were housed in collective cage and behavioural experiments were performed between 1 and 5 pm. Open-field and Forced swim test activities were analysed with Ethovision (Version 11.5, Noldus Technology, Wageningen, The Netherlands). In the open-field test, mice were placed in the arena (30 × 40 cm) and activity was recorded for a period of 10 min. The total distance travelled and the number of rotations were measured (every 360° turn is counted as one rotation). In the forced swim test, mice were placed in a cylinder (height, 30 cm; diameter, 21 cm) filled with water (25 °C). The activity, the total immobility and the number of rotation was recorded for a 2 min period. Immobility is defined by movements inferior to 2 cm s⁻¹.

Filopodia quantifications in COS-7 cells. The constructs used were as follows: untagged *Gz13* (Origene), pK-myc-*Gpsm2*^{FL48}, pEGFP-c-MyoXVa, pDsRed-c-whirlin and DsRed-empty (Clontech) or pK-myc-empty. Site-directed mutagenesis was used to generate mutations R127X (*Gpsm2*^{R127X}), Q562X (*Gpsm2*^{Q562X}), G491GfsX6 (*Gpsm2*^{G491GfsX6}) and R318RfsX8 (*Gpsm2*^{R318RfsX8}) on *Gpsm2* (QuickChange, Stratagene). We used an anti-myc (Covance mAb, #MMS-150P-200, 1:1,000), anti-*Gz13* (ref. 60 and Sigma G4040, 1:600), anti-GFP chicken (Abcam, pAb #ab13970, 1:3,000), anti-DsRed (Living color, mAb #632392, 1:1,500 and Living color, pAb #632496, 1:2,000), and Phalloidin conjugated with coumarin (Sigma #P2494, 1:500). Images were acquired using Zeiss Axiovision 4.7 and processed through Photoshop. For long-term assays (48 h), we considered a COS-7 (ATCC-American Type Culture Collection) 'filopodial cell' a cell with at least five long filopodia. For short-term assays of filopodia length, we split the cells after 48 h of transfection, and re-plated them on coverslips previously coated with 5 µg ml⁻¹ of poly-L-Lysine (PLL), and let them adhere for 2 h, before they are processed for immunocytochemistry. For the quantification of percentage of colocalization at the tip of filopodia, 500,000 COS-7 cells were transfected by nucleofection using an Ammax nucleofector kit (Lonza). After, 48 h the cells were re-plated on coverslips previously coated with 5 µg ml⁻¹ of PLL, and processed for immunocytochemistry after a 2 h adhesion. Cell appearing unhealthy were excluded from the analysis. Quantifications were performed blind to the experimental group using *ImageJ*.

Co-IP. For Co-IP, HEK293T (ATCC-American Type Culture Collection) were cultured on 10 cm dishes, transfected using polyethylenimine and harvested after 48 h in cold PBS. We used myc-tagged *Gpsm2* constructs and/or GFP-whirlin (whirlin was subcloned into the mammalian expression vectors pEGFP-C1-Clontech) or untagged whirlin constructs (generous gift from Professor C Petit, Pasteur Institute, Paris) and pEGFP-C3. Extracts were solubilized with Triton-X-100 and a cocktail of protease inhibitor (Complete ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-free, Roche), and processed as previously described⁴⁸. In brief, lysates were incubated with protein A/G or A resin ON with primary antibodies. The antibodies used were anti-myc (Millipore, pAb #06-549, 10 µg ml⁻¹), anti-GFP (Millipore, pAb #Ab3080P, 10 µg ml⁻¹), and IgG from rabbit serum (Sigma, pAb #15391, 3 µg ml⁻¹). After extensive washes, the beads were re-suspended in sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer immunoprecipitated proteins were analysed by SDS-PAGE and immunoblotting. Proteins were visualized using chemiluminescence-based immunodetection of horseradish peroxidase (Amersham). Each co-IP was replicated at least three times.

For endogenous co-IP, 10 hippocampi from P21 male and female rats were harvested and solubilized with 1% DOC and 1% Triton-X-100 in 50 mM Tris buffer pH 8 with protease inhibitors, and processed as previously described⁴⁸. In brief, lysates were incubated with 20 µl of pre-immune or *Gpsm2* serum⁴⁸ and with protein A resin ON. For immunoblots, we used anti-whirlin (ref. 17, pAb 10 µg), and the anti-*Gpsm2*^{Linker} (generous gift from Joe Blumer, Medical University South Carolina, USA) (ref. 46, pAb, 1:1,000).

GST pull-down. Different whirlin regions were cloned by polymerase chain reaction and inserted into pGEX-4T-1 (GE) to create in-frame fusions with GST.

GST-tagged whirlin 1–229 containing PDZ1, GST-whirlin 1–362 containing PDZ1 and PDZ2, GST-whirlin 276–362 containing PDZ2, GST-whirlin 276–907 containing secondary structures between PDZ2 and PDZ3, GST-whirlin 276–672 containing PDZ2 and the HN-L2 region, GST-whirlin 673–907 containing the proline-rich region and PDZ3, GST-whirlin 810–907 containing only the PDZ3 and GST-whirlin 363–809 containing the HN-L2 and proline-rich region were purified from *Escherichia coli* strain BL21 supernatants by standard affinity purification on glutathione-Sepharose 4B beads. In brief, bacterial pellets were re-suspended and incubated for 30 min on ice in TBS pH 7.5 lysis buffer containing 150 mM NaCl, 10–20 mM phosphate buffer and 0.1 mg ml⁻¹ lysozyme. Protease inhibitors were then added along with DTT (15 mM), EDTA (10 mM) and sarkosyl to a final concentration of 1.5%. The mixture was gently shaken, incubated for 15 min on ice and centrifuged for 1 h at 186,000 × g. Sarkosyl in the supernatant was neutralized with 2% Triton X-100 and the supernatant was incubated for 3 h at 4 °C on glutathione-sepharose 4B beads. The beads were washed three times with TBS pH 7.5 containing 0.1% Triton X-100 and re-suspended in TBS pH 7.5 with proteases inhibitors for later use.

A pull-down assay was performed with myc-*Gpsm2*^{R318RfsX8} overexpressed in HEK293T. HEK293T are re-suspended and sonicated in Tris-HCl pH 7.5 containing 5 mM EDTA, 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, proteases inhibitors and then solubilized 30 min with 1% Triton X-100 and 0.5% SDS. The lysate was centrifuged for 30 min at 150,000 × g. The supernatant containing myc-*Gpsm2*^{R318RfsX8} was incubated ON at 4 °C with GST alone or GST-whirlin fusion proteins. After four washes with buffer containing 0.1% Triton X-100, the bead pellets were re-suspended in SDS sample buffer and subjected to SDS-PAGE and immunoblotting. Interaction was evaluated with anti-myc antibody (Covance, mAb, 1:1,000). To evaluate GST amounts, the samples are loaded on SDS-PAGE and stained with Coomassie blue.

Western blot and immunoblot. HEK293T cells in six-well plates were co-transfected with 50, 100, 200 and 300 ng of myc-*Gpsm2*^{FL} in the presence of a constant concentration of DsRed-whirlin or DsRed-empty vector (50 ng), or with stable levels of *Gpsm2* with increasing concentrations of whirlin. In each condition, the total plasmid concentration was balanced with a control plasmid to a total per dish of 350 ng plasmid. After 48 h, the cells were collected using cold PBS, centrifuged and solubilized by sonication. Lysates were re-suspended in SDS sample buffer and subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with anti-myc (Covance, mAb 9E10, 1:1,000), anti-whirlin (Santa Cruz Biotech, mAb #sc-365250, 1:1,000), anti-DsRed (Living color, pAb #632436, 1:1,000), anti-GAPDH (Millipore, mAb #MAB374, 1:1,000), anti-GFP (Living color, mAb #632381, 1:1,000) followed by secondary antibodies (donkey anti-rabbit #CNA394V 1:5,000 or sheep anti-mouse IgG #CNA931V 1:5,000 conjugated to horseradish peroxidase, GE Healthcare UK). The membranes were processed with chemiluminescence (ECL, Thermo Scientific) as previously described⁶.

To evaluate the level of expression of *Gpsm2* truncated forms, we transfected the variants of *Gpsm2* in HEK293T and after 48 h the cells were harvested and the amount of protein evaluated by BCA assay. For each condition we pooled two wells (six-well plates), and equivalent protein levels were loaded and separated on polyacrylamide gels, and immunoblot performed with anti-myc antibody (Covance), and anti-GAPDH (Millipore). Quantifications were made using GS-800 calibrated densitometer Bio-Rad and Quantity One Analysis software (Bio-Rad). Unprocessed original scans of blots are shown in Supplementary Figs 3–7.

Actin polymerization assays. The amount of F-actin and G-actin was evaluated according to the Cytoskeleton Actin Polymerization Assay Kit (BK037, Cytoskeleton) protocol and as previously described⁶². HEK293T were transfected with a combination of pK-RFP/pK-YFP (control), or myc-*Gpsm2*/YFP-*Gz13* (ref. 48). 24 h after HEK293T transfection we reduced the levels of fetal bovine serum in the medium from 10 to 1%, and the next day, the cells were stimulated with fresh medium containing 10% fetal bovine serum for 30 min, then re-suspended in F-actin stabilization buffer with adenosine triphosphate (1 mM) and protease inhibitors.

Cortical and hippocampal neurons from P0 controls and *Gpsm2* cKO mice were dissociated and plated at a density of 200,000 cells per dish, and stimulated with KCl before harvesting at DIV3. For neuron stimulation, we used 20 mM KCl at 37 °C for 1 min, then collected the neurons in cold PBS before pelleted them at 3,000 × g for 5 min at 4 °C, and stored at –80 °C. To separate F-actin (pellet) from G-actin (supernatant) a 1 h centrifugation at 100,000 × g was performed on the lysate, then the pellet was re-suspended in a volume equivalent to the supernatant using F-actin depolymerizing buffer. Actin levels were quantified by immunoblot using an anti-actin antibody (Cytoskeleton, #AAN01, 1:500). For each condition we pooled three petri dishes. The expression levels were determined using a GS-800 calibrated densitometer and Quantity One Analysis software (Bio-Rad), and represented as a percentage of control band intensity. We used a total of 14 controls and 10 *Gpsm2* cKO mice.

Histology. For histology, brains were harvested and fixed in Bouin's fixative (Electron Microscopy Sciences) ON, dehydrated in ethanol, paraffin-embedded, and coronal sections (20 µm) obtained, before being stained with hematoxylin

and mounted with Entellan (Millipore). Brain sections were examined using Leica MZ-16 stereomicroscope using the NanoZoomer 2.0-HT slide scanner and analysed with the Hamamatsu NDP viewer software (Hamamatsu).

Neuronal cultures and transfections. Hippocampal neurons were dissociated from E 18 rat embryos as described⁴⁸ and electroporated with 2 µg of eGFP-Myo15a, myc-Gpsm2^{FL} and DsRed-whirlin using Amaxa nucleofector kit (Lonza). Approximately 500,000 cells were transfected via nucleofection plated on coverslips treated with 10 µg ml⁻¹ of PLL. After 2 days, neurons were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde at RT, then pre-incubated 30 min at RT in permeabilization buffer (PBS, 10% NGS, 0.1% triton). Cells were then incubated at RT for 1 h with chicken anti-GFP (Abcam, pAb #ab13970, 1:3,000), anti-myc (mAb, Covance, 1:1,000) and anti-DsRed (Clontech, pAb #632496, 1:3,000). Fluorescent images of the neurons were obtained using a confocal microscope (Leica SP8) and processed with Adobe Photoshop.

Videomicroscopy and sptPALM-TIRF. Regular 18-mm glass coverslips were incubated for 2 h at 37 °C with 1 mg ml⁻¹ PLL in 0.1 M borate buffer (pH 8.5), rinsed with H₂O, then incubated 2 h at 37 °C with 4 µg per coverslip of goat anti-human Fc (Jackson ImmunoResearch) in 0.2 M boric acid (pH 8.5), before another incubation ON at 4 °C with 0.2 µg per cover (stpPALM-TIRF) and 0.6 µg per coverslip (time-lapse) of N-cadherin-Fc. Before use, the coverslips were rinsed again with boric acid. For laminin, coverslips were coated with 1 mg ml⁻¹ PLL and then laminin (5 µg per cover).

For time-lapse experiments (growth cone outgrowth), hippocampal neurons from newborn (P0/1) pups were plated at a density of 50,000 cells per coverslip. Neurons were used after 2 DIV. Neurons were covered with 700 µl of Tyrode solution (120 NaCl mM, 5 KCl mM, 2 MgCl₂ mM, 2 CaCl₂ mM, 25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, and 30 mM d-glucose, pH 7.4), and observed under an inverted Leica DMI 6000 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) using a HCX PL APO CS × 63 oil 1.32 numerical aperture objective and differential interference contrast illumination (Lumencor, Beaverton, USA). Images were acquired every 1 min for 30 min using a HQ2 camera (Photometrics, Tucson, USA) driven by the MetaMorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). The multi-positions were done with a motorized stage Scan IM (Märzhäuser, Wetzlar, Germany). Temperature was maintained at 37 °C. The system was controlled by MetaMorph software. Quantification of neuron growth cone speed was performed using ImageJ software plugin 'manual tracking'. The average speed (in µm min⁻¹) was quantified as this distance divided by 30 min. A 'pause' is when no movement (within the pointing accuracy of the growth cone centroid) of the growth cone is observed over two consecutive time-lapse images (1 min image⁻¹), while maintaining filopodial activity.

The stpPALM-TIRF experiments were done as described in ref. 63. In brief, coverslips were mounted in a chamber and placed on a Nikon Ti Eclipse inverted microscope (Nikon France S.A.S., Champigny-sur-Marne, France) equipped with a TIRF arm coupled to a fibre optic linked to a four-colour laser bench (Roper Scientific). Images were acquired using an Apo TIRF 100 × oil numerical aperture 1.49 objective, and a sensitive EMCCD camera (Evolve, Photometrics, Tucson, USA). Photoswitching of mEos2 was done at 405 nm, converting the molecule into a red-emitting form, which was detected using the 561 nm laser and a long-pass emission filter. All the equipment was driven by the software Metamorph. Image stacks of 320 frames were acquired in time-lapse mode at a frequency of two images per second, with a camera exposure time of 250 ms. This procedure ensures that fast-diffusing actin monomers which contribute to a blur in the images are eliminated from subsequent analysis, and that only slowly moving actin molecules incorporated in filaments are retained^{63,64}. Experiments were done on 11 growth cones for control and 12 growth cones for cKO Gpsm2 neurons, from at least three separate experiments.

Speed and trajectories analysis. Actin trajectories recorded by sptPALM were computed and analysed using custom-made algorithms written as a MetaMorph plug-in as described in ref. 63. Single-molecule localization was performed using a wavelet-based algorithm, and trajectories were computed using a simulated annealing algorithm⁶⁵. The trajectory duration, which corresponds to the time during which single mEos2 fluorophores emit red light upon 561 nm laser illumination, follows an exponential distribution strongly shifted to short values. Only trajectories longer than seven frames in regions of interest were kept, which yielded a median of around nine frames. The proportion of trajectories with more than seven points is 80% in control and 78% Gpsm2 cKO growth cones respectively. The MSD function was computed for each trajectory over time, and fit by the power law MSD = 4D^αt^α using Kaleidagraph 4.1, where *t* is the time, *D* is an adjustable coefficient and the exponent *α* (values between 0 and 2) reflects the curvature of the MSD function and the type of movement. For highly directed trajectories, the MSD is a quadratic function of time, thus *α* is close to 2 (ref. 64,66). The numbers of trajectories analysed were 1344 (controls) and 1121 mutants.

Statistical analyses were carried out using Prism statistical package (GraphPad). Normality of distribution and homogeneity of variance were validated and statistical

significance between means was calculated using unpaired Student's *t*-test or Mann-Whitney test when normality test failed. *P* < 0.05 was considered significant.

Data availability. All data are available from the authors.

References

- Chudley, A. E., McCullough, C. & McCullough, D. W. Bilateral sensorineural deafness and hydrocephalus due to foramen of Monro obstruction in sibs: a newly described autosomal recessive disorder. *Am. J. Med. Genet.* **68**, 350–356 (1997).
- Doherty, D. *et al.* GPSM2 mutations cause the brain malformations and hearing loss in Chudley-McCullough syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 1088–1093 (2012).
- Walsh, T. *et al.* Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GPSM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82. *Am. J. Hum. Genet.* **87**, 90–94 (2010).
- Yariz, K. O. *et al.* A truncating mutation in GPSM2 is associated with recessive non-syndromic hearing loss. *Clin. Genet.* **81**, 289–293 (2012).
- Peyre, E. & Morin, X. An oblique view on the role of spindle orientation in vertebrate neurogenesis. *Dev. Growth Differ.* **54**, 287–305 (2012).
- Ezan, J. *et al.* Primary cilium migration depends on G-protein signalling control of subapical cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1107–1115 (2013).
- Ezan, J. & Montcouquiol, M. Revisiting planar cell polarity in the inner ear. *Semin. Cell Dev. Biol.* **24**, 499–506 (2013).
- Tarchini, B., Jolicœur, C. & Cayouette, M. A molecular blueprint at the apical surface establishes planar asymmetry in cochlear hair cells. *Dev. Cell.* **27**, 88–102 (2013).
- Tarchini, B., Tadenev, A. L., Devanney, N. & Cayouette, M. A link between planar polarity and staircase-like bundle architecture in hair cells. *Development* **143**, 3926–3932 (2016).
- Barr-Gillespie, P. G. Assembly of hair bundles, an amazing problem for cell biology. *Mol. Biol. Cell* **26**, 2727–2732 (2015).
- Tilney, L. G., Derosier, D. J. & Mulroy, M. J. The organization of actin filaments in the stereocilia of cochlear hair cells. *J. Cell Biol.* **86**, 244–259 (1980).
- Schneider, M. E., Belyantseva, I. A., Azevedo, R. B. & Kachar, B. Rapid renewal of auditory hair bundles. *Nature* **418**, 837–838 (2002).
- Drummond, M. C. *et al.* Live-cell imaging of actin dynamics reveals mechanisms of stereocilia length regulation in the inner ear. *Nat. Commun.* **6**, 6873 (2015).
- Petit, C. & Richardson, G. P. Linking genes underlying deafness to hair-bundle development and function. *Nat. Neurosci.* **12**, 703–710 (2009).
- Schwander, M., Kachar, B. & Müller, U. The cell biology of hearing. *J. Cell Biol.* **190**, 9–20 (2010).
- Brown, S. D., Hardisty-Hughes, R. E. & Mburu, P. Quiet as a mouse: dissecting the molecular and genetic basis of hearing. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 277–290 (2008).
- Belyantseva, I. A. *et al.* Myosin-XVa is required for tip localization of whirlin and differential elongation of hair-cell stereocilia. *Nat. Cell Biol.* **7**, 148–156 (2005).
- Delprat, B. *et al.* Myosin XVa and whirlin, two deafness gene products required for hair bundle growth, are located at the stereocilia tips and interact directly. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 401–410 (2005).
- Manor, U. *et al.* Regulation of stereocilia length by myosin XVa and whirlin depends on the actin-regulatory protein Eps8. *Curr. Biol.* **21**, 167–172 (2011).
- Holme, R. H., Kiernan, B. W., Brown, S. D. & Steel, K. P. Elongation of hair cell stereocilia is defective in the mouse mutant whirler. *J. Comp. Neurol.* **450**, 94–102 (2002).
- Probst, F. J. *et al.* Correction of deafness in *shaker-2* mice by an unconventional myosin in a BAC transgene. *Science* **280**, 1444–1447 (1998).
- Zampini, V. *et al.* Eps8 regulates hair bundle length and functional maturation of mammalian auditory hair cells. *PLoS Biol.* **9**, e1001048 (2011).
- Mburu, P. *et al.* Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31. *Nat. Genet.* **34**, 421–428 (2003).
- Ebermann, I. *et al.* A novel gene for Usher syndrome type 2: mutations in the long isoform of whirlin are associated with retinitis pigmentosa and sensorineural hearing loss. *Hum. Genet.* **121**, 203–211 (2007).
- Wang, A. *et al.* Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science* **280**, 1447–1451 (1998).
- Behloul, A. *et al.* EPS8, encoding an actin-binding protein of cochlear hair cell stereocilia, is a new causal gene for autosomal recessive profound deafness. *Orphanet. J. Rare Dis.* **9**, 55 (2014).

27. Schneider, M. E. *et al.* A new compartment at stereocilia tips defined by spatial and temporal patterns of myosin IIIa expression. *J. Neurosci.* **26**, 10243–10252 (2006).
28. Stepanyan, R. & Frolenkov, G. I. Fast adaptation and Ca²⁺ sensitivity of the mechanotransducer require myosin-XVa in inner but not outer cochlear hair cells. *J. Neurosci.* **29**, 4023–4034 (2009).
29. Anderson, D. W. *et al.* The motor and tail regions of myosin XV are critical for normal structure and function of auditory and vestibular hair cells. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1729–1738 (2000).
30. Xiang, M., Gao, W.-Q., Hasson, T. & Shin, J. J. Requirement for Brn-3c in maturation and survival, but not in fate determination of inner ear hair cells. *Development* **125**, 3935–3946 (1998).
31. Bhonker, Y. *et al.* The GPM2/LGN GoLoco motifs are essential for hearing. *Mamm. Genome* **27**, 29–46 (2016).
32. Siderovski, D. P. & Willard, F. S. The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int. J. Biol. Sci.* **1**, 51–66 (2005).
33. Blumer, J. B. & Lanier, Sr. M. Activators of G protein signalling exhibit broad functionality and define a distinct core signalling triad. *Mol. Pharmacol.* **85**, 388–396 (2014).
34. Mallavarapu, A. & Mitchison, T. Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *J. Cell Biol.* **146**, 1097–1106 (1999).
35. Symons, M. H. & Mitchison, T. J. Control of actin polymerization in live and permeabilized fibroblasts. *J. Cell Biol.* **114**, 503–513 (1991).
36. Giannone, G., Mège, R. M. & Thoumine, O. Multi-level molecular clutches in motile cell processes. *Trends Cell Biol.* **19**, 475–486 (2009).
37. Lin, C. H. & Forscher, P. Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron* **14**, 763–771 (1995).
38. Fang, Q. *et al.* The 133-kDa N-terminal domain enables myosin 15 to maintain mechanotransducing stereocilia and is essential for hearing. *Elife* **4** (2015).
39. Du, Q. & Macara, I. G. Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell* **119**, 503–516 (2004).
40. Zeytuni, N. & Zarivach, R. Structural and functional discussion of the tetra-trico-peptide repeat, a protein interaction module. *Structure* **20**, 397–405 (2012).
41. Carminati, M. *et al.* Concomitant binding of Afadin to LGN and F-actin directs planar spindle orientation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 155–163 (2016).
42. Gohla, A. *et al.* An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein Gi3 in the antiapoptotic action of insulin in the liver. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 3003–3008 (2007).
43. Zhuravlev, P. I., Lan, Y., Minakova, M. S. & Papoiana, G. A. Theory of active transport in filopodia and stereocilia. *PNAS* **109**, 10849–10854 (2012).
44. Sousa, A. D. & Cheney, R. E. Myosin-X: a molecular motor at the cell's fingertips. *Trends Cell Biol.* **15**, 533–539 (2005).
45. Revenu, C., Athman, R., Robine, S. & Louvar, D. The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 635–646 (2004).
46. Blumer, J. B., Chandler, L. J. & Lanier, S. M. Expression analysis and subcellular distribution of the two G-protein regulators AGS3 and LGN indicate distinct functionality: localization of LGN to the midbody during cytokinesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 15897–15903 (2002).
47. Wang, L., Zou, J., Shen, Z., Song, E. & Yang, J. Whirlin interacts with espin and modulates its actin-regulatory function: an insight into the mechanism of Usher syndrome type II. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 692–710 (2012).
48. Sans, N. *et al.* mPins modulates PSD-95 and SAP102 trafficking and influences NMDA receptor surface expression. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1179–1190 (2005).
49. Stamatakou, E., Marzo, A., Gibb, A. & Salinas, P. C. Activity-dependent spine morphogenesis: a role for the actin-capping protein Eps8. *J. Neurosci.* **33**, 2661–2670 (2013).
50. Liang, Y. *et al.* Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness *DFNB3* and *Shaker 2*. *Genomics* **61**, 243–258 (1999).
51. Watanabe, T. M., Tokuo, H., Gonda, K., Higuchi, H. & Ikebe, M. Myosin-X induces filopodia by multiple elongation mechanism. *J. Biol. Chem.* **285**, 19605–19614 (2010).
52. Berg, J. S. & Cheney, R. E. Myosin-X is an unconventional myosin that undergoes intrafilopodial motility. *Nat. Cell Biol.* **4**, 246–250 (2002).
53. Kerber, M. L. *et al.* A novel form of motility in filopodia revealed by imaging myosin-X at the single-molecule level. *Curr. Biol.* **9**, 967–973 (2009).
54. Konno, D. *et al.* Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat. Cell Biol.* **10**, 93–101 (2008).
55. Shioi, G., Konno, D., Shitamukai, A. & Matsuzaki, F. Structural basis for self-renewal of neural progenitors in cortical neurogenesis. *Cereb. Cortex* **19**, i55–i61 (2009).
56. Gohla, A. *et al.* An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein G₁₃ in the antiapoptotic action of insulin in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 3003–3008 (2007).
57. Hebert, J. M. & McConnell, S. K. Targeting of cre to the Foxg1 (BF-1) locus mediates loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures. *Dev. Biol.* **222**, 296–306 (2000).
58. Pirvola, U. *et al.* FGFR1 is required for the development of the auditory sensory epithelium. *Neuron* **35**, 671–680 (2002).
59. Gorski, J. A. *et al.* Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J. Neurosci.* **22**, 6309–6314 (2002).
60. Köhler, D. *et al.* G_{12i}- and G_{13i}-deficient mice display opposite severity of myocardial ischemia reperfusion injury. *PLoS ONE* **9**, e98325 (2014).
61. Davies, S. & Forge, A. Preparation of the mammalian organ of Corti for scanning electron microscopy. *J. Microsc.* **147**, 89–101 (1987).
62. Durand, C. *et al.* SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. *Mol. Psychiatry* **17**, 71–84 (2012).
63. Garcia, M. *et al.* Two-tiered coupling between flowing actin and immobilized N-cadherin/catenin complexes in neuronal growth cones. *PNAS USA* **112**, 6997–7002 (2015).
64. Frost, N. A., Shroff, H., Kong, H., Betzig, E. & Blanpied, T. A. Single-molecule discrimination of discrete perisynaptic and distributed sites of actin filament assembly within dendritic spines. *Neuron* **67**, 86–99 (2010).
65. Izeddin, I. *et al.* Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. *Opt. Express* **20**, 2081–2095 (2012).
66. Qian, H., Sheetz, M. P. & Elson, E. L. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys. J.* **60**, 910–921 (1991).

Acknowledgements

We are indebted to members of the Magendie animal Housing and Genotyping facilities funded by INSERM, to the Biochemistry and Biophysics Facility of the Bordeaux Neurocampus and to the personnel of the Bordeaux Imaging Center (BIC, a service unit of the CNRS-INSERM & Bordeaux University, member of France BioImaging, national infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INSB-04, 'Investments for the Future'). All these facilities are funded by the LabEX BRAIN ANR-10-LABX-43. This work was supported by INSERM, Region Aquitaine support and the ANR GHeARAct (ANR-14-CE13-0013-01) to M.M. S.A.M. is supported by a MRT fellowship and S.D.-S.C. was supported by an ENC Neurasms Ph.D. fellowship and a FRM '4eme année de these' (FDT20150532542). B.N. and S.B.-H. are funded by DFG and ICoPha. This work was supported in part by funds from the NIDCD Division of Intramural Research/NIH DC000048-19 to T.F.B.

Author contributions

S.A.M. and Y.E.H. contributed equally to this work. M.M. and N.S. conceived the project, designed the experiments and analysed data. B.N. and S.B.-H. assisted with experimental design and interpretation of all aspects of G₁₃-protein interaction. M.M. performed cochlear cultures, confocal and STED acquisition; S.A.M. and M.M. performed cochlear dissections and immunocytochemistry; A.F. performed SEM images acquisition; S.A.M. performed SEM quantifications, COS-7 experiments, protein levels assays; R.P. generated mutagenesis, and performed actin assays; S.A.M. and N.S. performed co-IP; J.-M.B. and S.M. performed GST pull-down. C.M. and Y.E.H. performed neuronal cultures and nucleofection; Y.E.H. and S.C. performed stpPALM, videomicroscopy and analysis under O.T. supervision; Y.E.H. and S.A.M. performed brain anatomy; M.M.M. performed the behavioural analysis; S.C.L. and L.R. performed and analysed ABR. B.N. and S.B.-H. generated transgenic G₁₃, anti-G₁₃-antibody. J.E.B. and T.B.F. provided mutant cochlea, tools and data regarding myosin 15 and whirlin, and assisted with experimental design and interpretation. M.M. wrote the manuscript, and all authors commented on it.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Mauriac, S. A *et al.* Defective G α _s signalling disrupts stereocilia development and growth cone actin dynamics in Chudley-McCullough syndrome. *Nat. Commun.* **8**, 14907 doi: 10.1038/ncomms14907 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

Author Correction: Defective Gpsm2/G α_{i3} signalling disrupts stereocilia development and growth cone actin dynamics in Chudley-McCullough syndrome

Stephanie A. Mauriac, Yeri E. Hien, Jonathan E. Bird, Steve Dos-Santos Carvalho, Ronan Peyroutou, Sze Chim Lee, Maite M. Moreau, Jean-Michel Blanc, Aysegul Gezer, Chantal Medina, Olivier Thoumine, Sandra Beer-Hammer, Thomas B. Friedman, Lukas Rüttiger, Andrew Forge, Bernd Nürnberg, Nathalie Sans & Mireille Montcouquiol

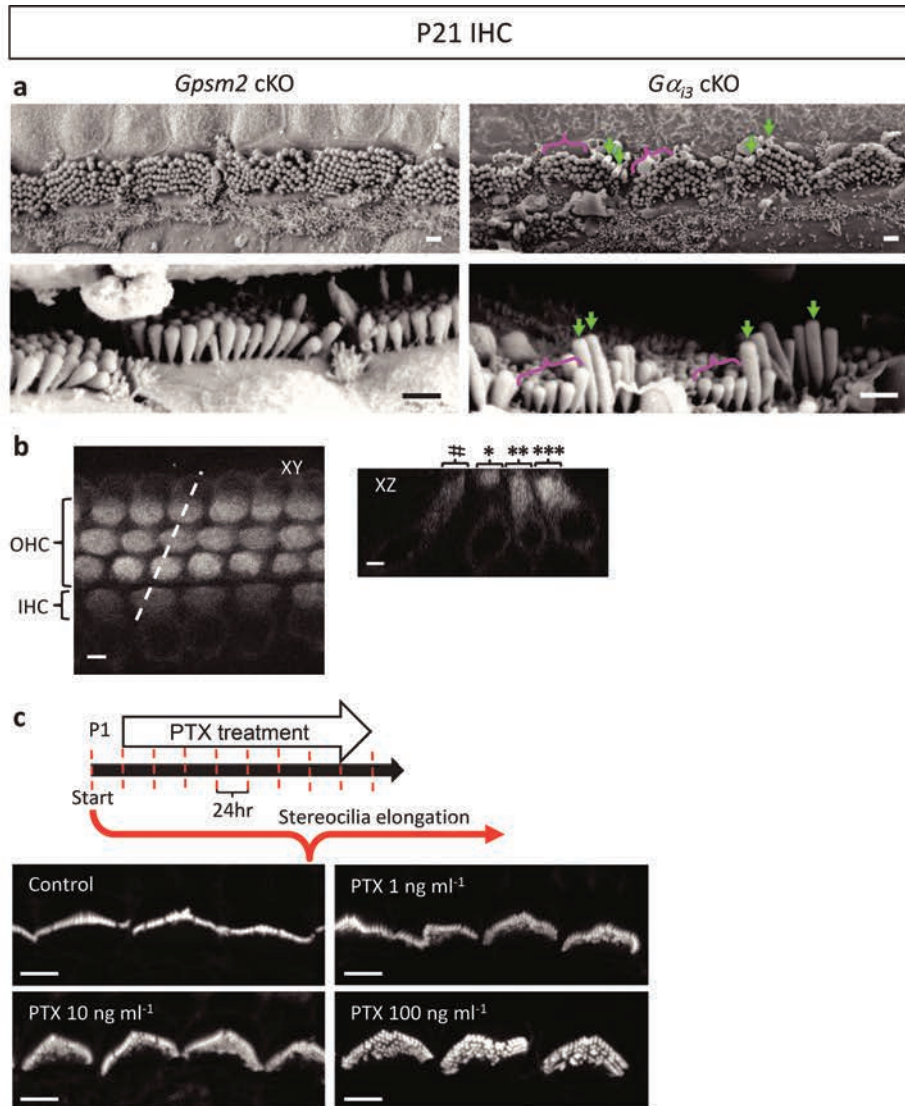
Nature Communications 8:14907 doi: 10.1038/ncomms14907 (2017); Published 7 Apr 2017; Updated 25 May 2018

The original version of this Article contained an error in the spelling of the author Aysegul Gezer, which was incorrectly given as Aysegul Geysler. This has now been corrected in both the PDF and HTML versions of the Article.

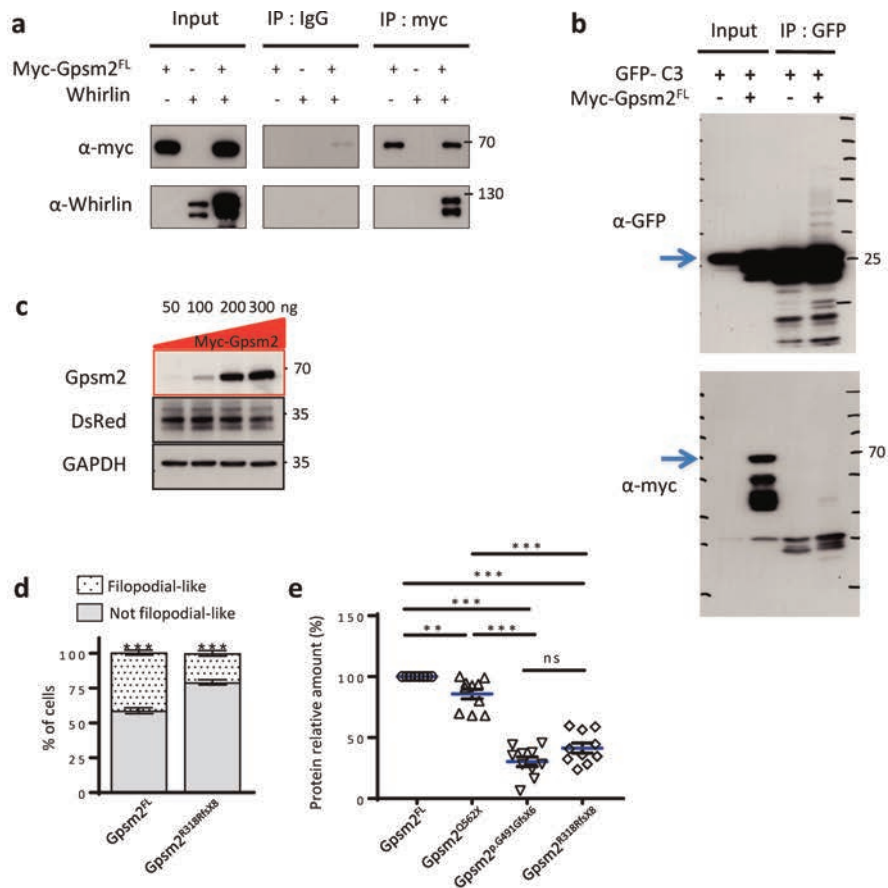


Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2018

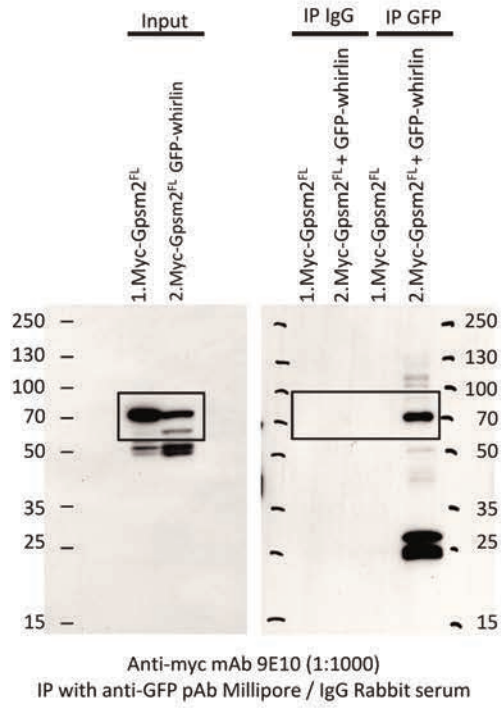
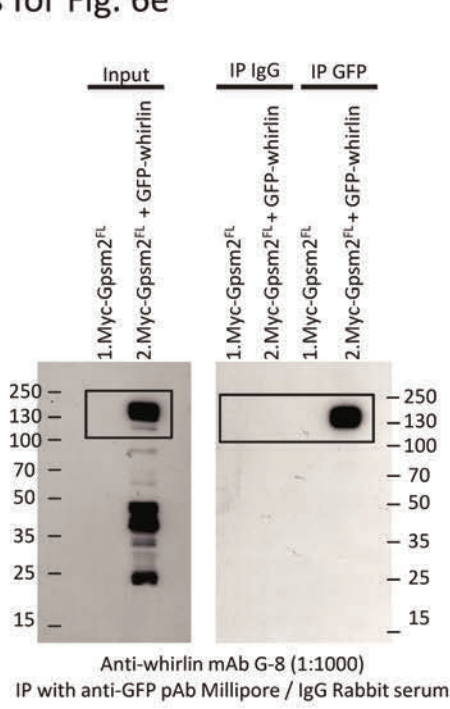


Supplementary Figure 1. *Gpsm2* and *Gnai3* mutations inhibit stereocilia elongation. (a) SEM of surface (top panels) and lateral (bottom panels) views of midbasal region of the cochlear epithelia of P21 mouse in *Gpsm2* (left panels) or *Gnai3* (right panels) cKOs. Whereas in *Gpsm2* cKO all of the stereocilia are shorter, in *Gnai3* cKO we observed short (magenta brackets) and long (green arrows) stereocilia within the same hair bundle. Scale bar, 1 μ m. (b) Surface view (XY) and lateral view (XZ) of the cochlear epithelium of P5 pups (*Pou4f3-Cre* mice and *Ai6* mice). ZsGreen is expressed in IHCs and OHCs, validating the Cre recombinase excision in these cells. (c) Timeline of PTX treatment for cochlear explants. The cochleae are harvested at P1 and after 24 hr *in vitro*, the PTX is applied for 8 additional days *in vitro* before immunocytochemistry or SEM treatment. Bottom panel: surface views of postnatal cochlear explants treated for 8 days with increasing concentrations of PTX. The hair bundles display a phenotype similar to *Gnai3* cKOs, with supernumerary rows of shorter stereocilia. Scale bar (b,c), 4 μ m.

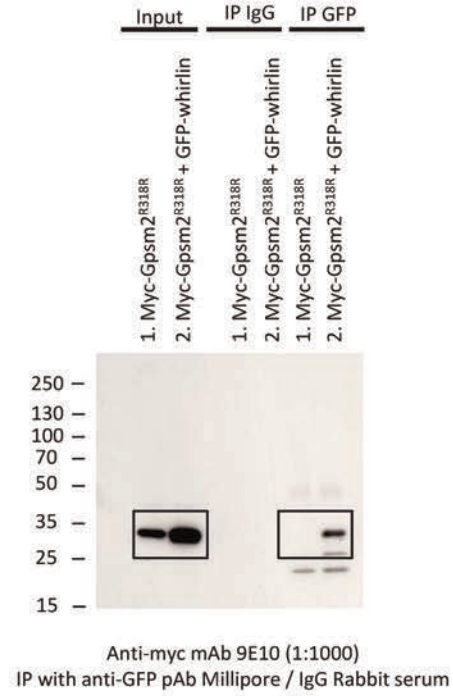
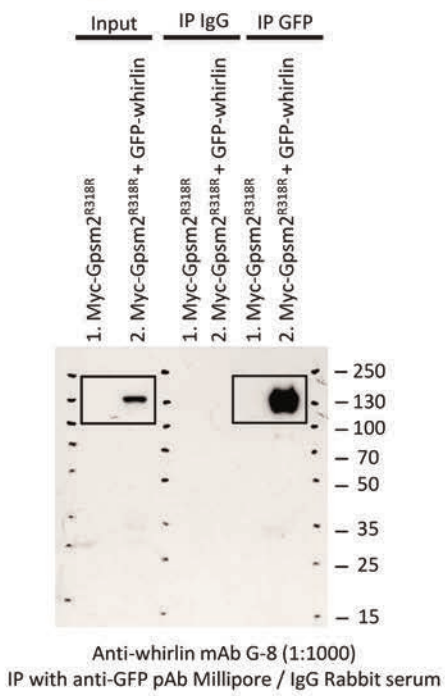


Supplementary Figure 2. A new complex between Gpsm2 and whirlin controls filopodia elongation. (a) Immunoprecipitation of Gpsm2^{FL} and whirlin with anti-myc. Membranes were immunoblotted with the antibodies indicated on the left. **(b)** Immunoprecipitation of Gpsm2^{FL} with GFP alone. **(c)** Increasing doses of Gpsm2 has no effect on an empty vector (DsRed) levels. **(d)** Expression of Gpsm2^{R318RfsX8} variant with whirlin and myosin 15 leads to a decrease in the number of COS-7 with filopodia when compared with cells transfected with myc-Gpsm2^{FL}. Data are represented as the percentage of the total number of the filopodia counted in each condition (n=154 to 173 cells) from three separate experiments. *** $P < 0.001$ with unpaired student's t test. (\pm s.e.m.). **(e)** Quantitative analysis of the various protein levels of myc-Gpsm2. * $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ with one sample t test or one way Anova (post-hoc Bonferonni's test). ns, not significant.

Blots for Fig. 6e

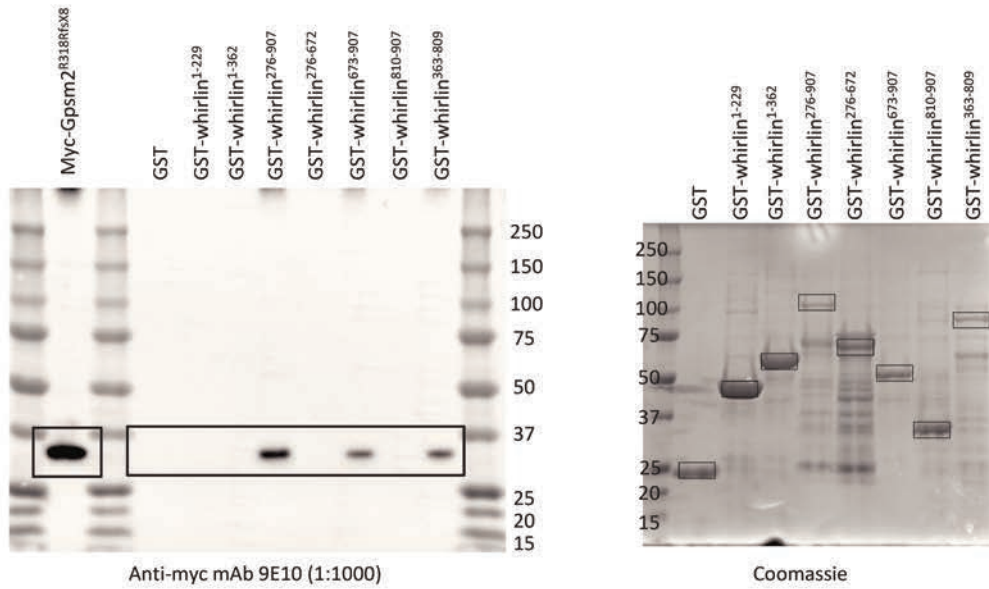


Blots for Fig. 6f

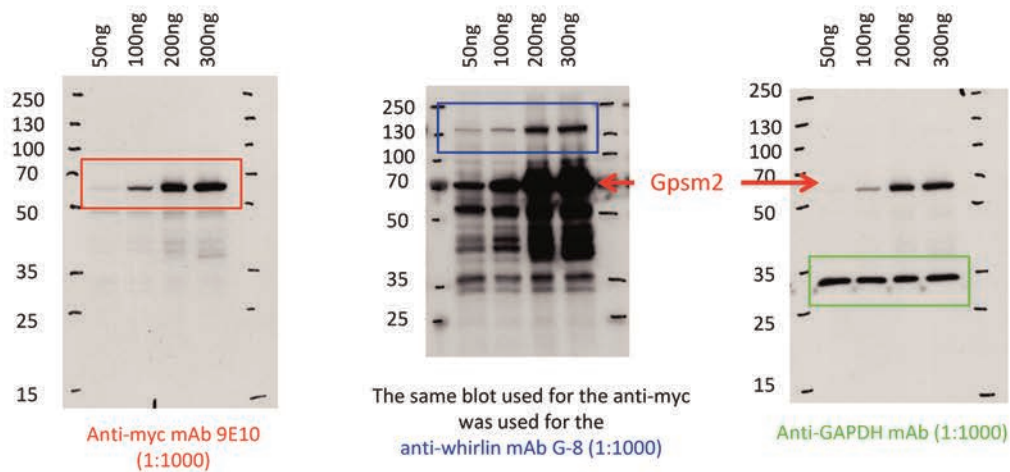


Supplementary Figure 3. Full scans of Western blots shown in Figures 6e,f.

Blots for Fig. 6g

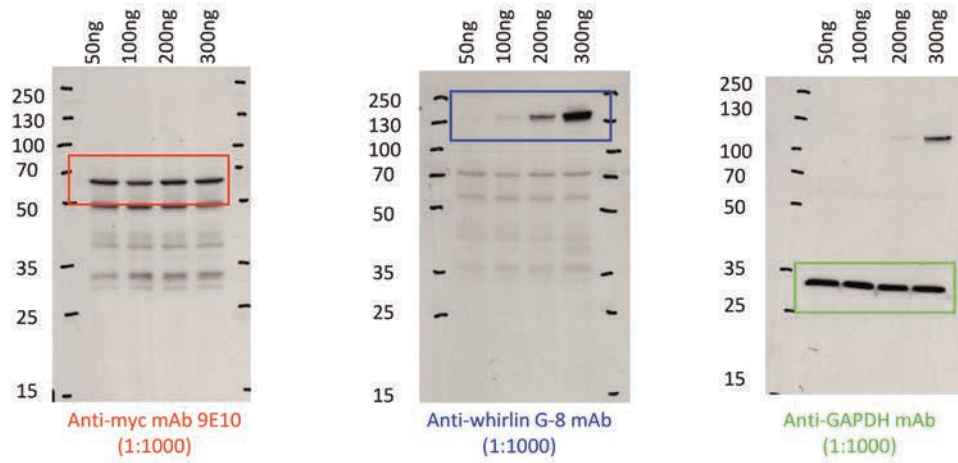


Blots for Fig. 6h

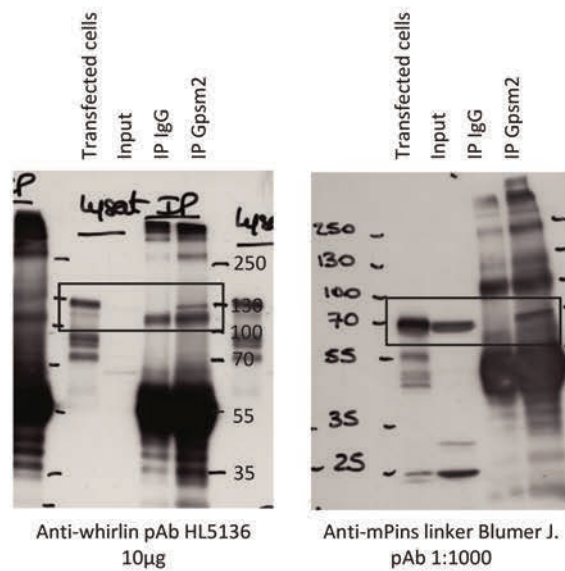


Supplementary Figure 4. Full scans of Western blots shown in Figures 6g,h

Blots for Fig. 6i

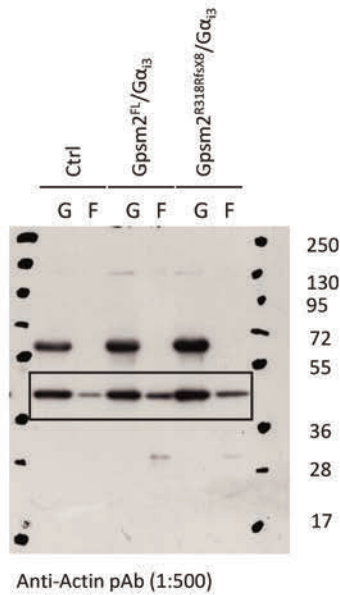


Blots for Fig. 8f

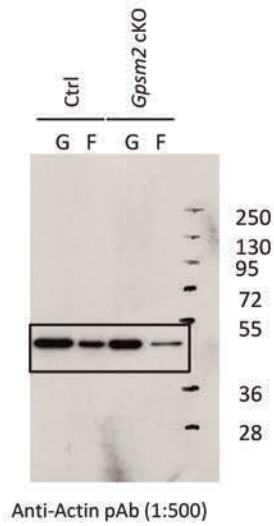


Supplementary Figure 5. Full scans of Western blots shown in Figures 6i and 8f.

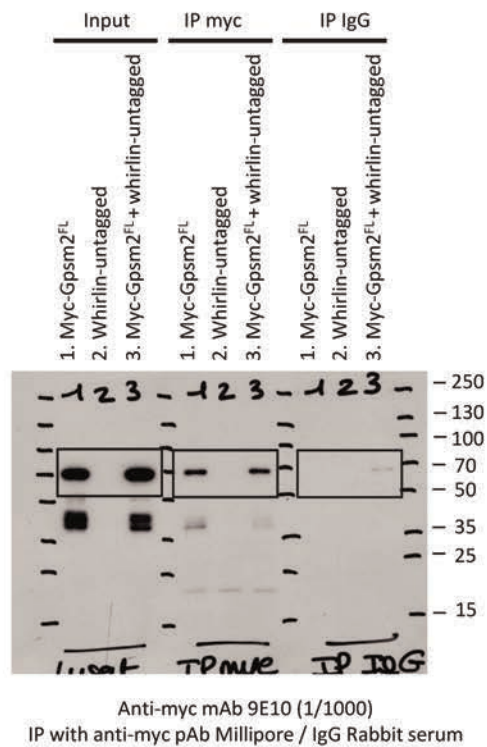
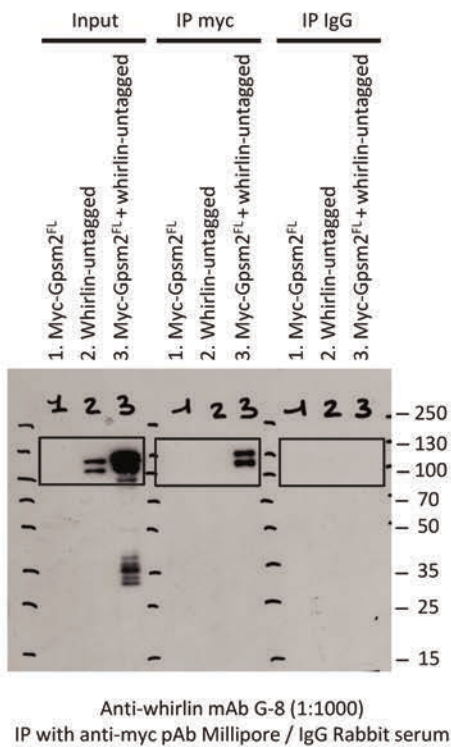
Blot for Fig. 8h



Blots for Fig. 8i

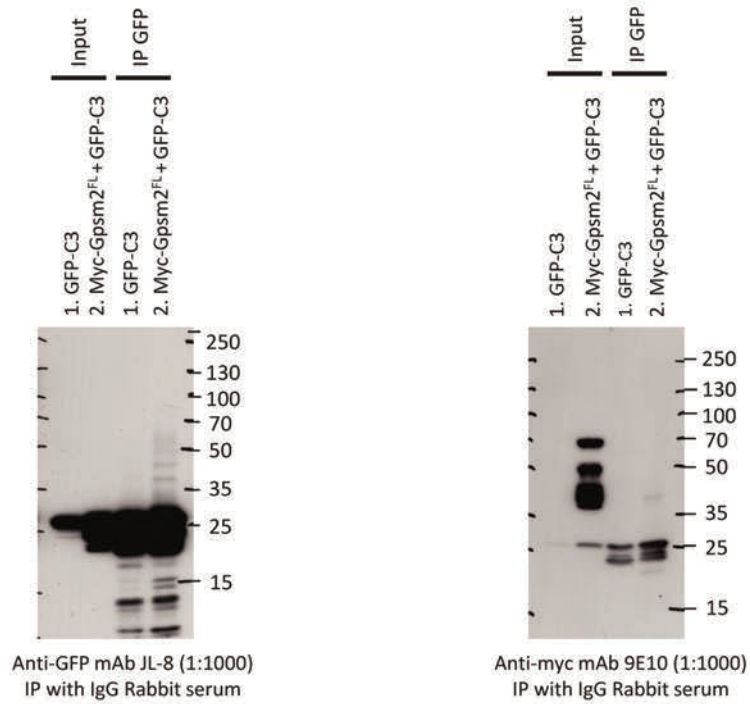


Blots for Supplementary Fig. 2a

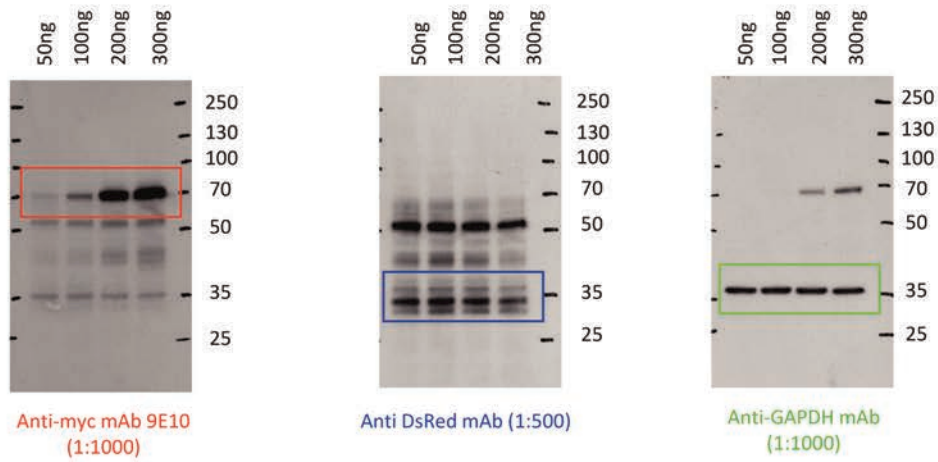


Supplementary Figure 6. Full scans of Western blots shown in Figures 8h, i and Supplementary Figures 2a

Blots for Supplementary Fig. 2b



Blots for Supplementary Fig. 2c



Supplementary Figure 7. Full scans of Western blots shown in Supplementary Figures 2b,c

Gα i proteins are indispensable for hearing

Sandra Beer-Hammer, Sze Chim Lee, **Stephanie A. Mauriac**, Veronika Leiss, Isabel A. M. Groh, Ana Novakovic, Roland P. Piekorz, Kirsten Bucher, Chengfang Chen, Kun Ni, Wibke Singer, Csaba Harasztosi, Thomas Schimmang, Ulrike Zimmermann, Klaus Pfeffer, Lutz Birnbaumer, Andrew Forge, Mireille Montcouquiol, Marlies Knipper, Bernd Nürnberg, Lukas Rüttiger.

(article publié dans Cellular Physiology and Biochemistry en 2018)

Introduction

Chez les invertébrés, les protéines G hétérotrimérique alpha i (G α i) liées à leur partenaire Gpsm2, sont connues pour être indispensable à la mise en place du fuseau de division mitotique lors de la division asymétrique des cellules. Cette voie de signalisation, conservée chez les mammifères, est indispensable à la fonction auditive et joue un rôle sur le positionnement du kinocil et sur l'élongation des stéréocils d'actine dans les CC. Les souris mutées pour *Gnai3* (*Gnai3^{Foxg1}*) présentent une augmentation du seuil auditif uniquement pour les hautes fréquences, soit pour les sons aigus codés à la base de la cochlée. Ces données originales suggèrent une compensation de la fonction de G α i3 à l'apex de la cochlée. Le Dr Rüttiger a alors émis l'hypothèse que cette fonction est remplie par la protéine G α i2, aussi exprimée au niveau de la cochlée. Pour cela, une étude approfondie des souris mutées pour G α i2 (*Gnai2^{Foxg1}*) G α i3 (*Gnai3^{Foxg1}*) ou G α i2/G α i3 (*Gnai2/3^{Foxg1}*) a été réalisée.

Résultats

- L'absence de G α i3 induit une augmentation du seuil auditif pour les hautes fréquences alors que G α i2 n'affecte pas la fonction auditive. L'absence simultanée de ces deux isoformes conduit à une surdité sévère et précoce tout comme les souris mutées pour *Gpsm2*.
- G α i3 est exprimé le long de l'organe de Corti alors que G α i2 uniquement à l'apex.
- G α i2 compense la fonction de G α i3 uniquement à l'apex de la cochlée.
- G α i2 et G α i3 sont indispensables à la maturité synaptique à la base des CCI.
- G α i3 est exprimée au niveau du ganglion spiral et son absence affecte l'activité du nerf auditif.

Conclusion

L'ensemble de ces données mettent en évidence que les protéines G α i2 et G α i3 sont essentielles à la fonction auditive. Ces protéines sont indispensables pour la morphologie et la maturité apicale et synaptique des CC.

Original Paper

Gα_i Proteins are Indispensable for Hearing

Sandra Beer-Hammer^a Sze Chim Lee^b Stephanie A. Mauriac^{c,d}
Veronika Leiss^a Isabel A. M. Groh^a Ana Novakovic^a Roland P. Piekorz^e
Kirsten Bucher^a Chengfang Chen^b Kun Ni^b Wibke Singer^b Csaba Harasztosif
Thomas Schimmang^g Ulrike Zimmermann^b Klaus Pfeffer^h Lutz Birnbaumer^{ij}
Andrew Forge^k Mireille Montcouquiol^{c,d} Marlies Knipper^b Bernd Nürnberg^a
Lukas Rüttiger^b

^aDepartment of Pharmacology and Experimental Therapy, and Interfaculty Center of Pharmacogenomics and Drug Research (ICePhA), University of Tübingen, Tübingen, Germany, ^bMolecular Physiology of Hearing, Tübingen Hearing Research Centre, Department of Otolaryngology, University of Tübingen, Tübingen, Germany; ^cINSERM, Neurocentre Magendie, Bordeaux, France; ^dUniversity of Bordeaux, Neurocentre Magendie, Bordeaux, France; ^eInstitute for Biochemistry and Molecular Biology II, Medical Faculty, University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany, ^fDepartment of Otolaryngology, Tübingen Hearing Research Center, Section of Physiological Acoustics and Communication, University of Tübingen, Tübingen, Germany; ^gInstituto de Biología y Genética Molecular, Universidad de Valladolid y Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valladolid, Spain; ^hInstitute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; ⁱNeurobiology Laboratory, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institute of Health, Research Triangle Park, USA; ^jInstitute of Biomedical Research (BIOMED), School of Medical Sciences, Catholic University of Argentina, Buenos Aires, Argentina; ^kUCL Ear Institute, London, UK

Key Words

Heterotrimeric G-proteins • Gα₁₃/GNAI3 • Stereocilia bundle • Cochlear hair cell maturation • Neural gain • Deafness gene

Abstract

Background/Aims: From invertebrates to mammals, Gα_i proteins act together with their common binding partner Gpsm2 to govern cell polarization and planar organization in virtually any polarized cell. Recently, we demonstrated that Gα₁₃-deficiency in pre-hearing murine cochleae pointed to a role of Gα₁₃ for asymmetric migration of the kinocilium as well as the orientation and shape of the stereociliary ("hair") bundle, a requirement for the progression of mature hearing. We found that the lack of Gα₁₃ impairs stereociliary elongation and hair bundle shape in high-frequency cochlear regions, linked to elevated hearing thresholds for high-frequency sound. How these morphological defects translate into hearing phenotypes is not clear. **Methods:** Here, we studied global and conditional *Gnai3* and *Gnai2* mouse mutants deficient for either one or both Gα_i proteins. Comparative analyses of global versus Foxg1-driven conditional mutants that mainly delete in the inner ear and telencephalon in combination with functional tests were applied to dissect essential and redundant functions of different Gα_i isoforms and to assign specific defects to outer or inner hair cells, the auditory nerve, satellite

Prof. Dr. Bernd Nürnberg
and PD Dr. Lukas Rüttiger

Department of Pharmacology and Experimental Therapy, University Tübingen,
Wilhelmstr. 56, D-72074 Tübingen (Germany); Tel. +49 7071 2974590,
E-Mail bernd.nuernberg@uni-tuebingen.de / lukas.ruettiger@uni-tuebingen.de

cells or central auditory neurons. **Results:** Here we report that lack of $G\alpha_{i3}$ but not of the ubiquitously expressed $G\alpha_{i2}$ elevates hearing threshold, accompanied by impaired hair bundle elongation and shape in high-frequency cochlear regions. During the crucial reprogramming of the immature inner hair cell (IHC) synapse into a functional sensory synapse of the mature IHC deficiency for $G\alpha_{i2}$ or $G\alpha_{i3}$ had no impact. In contrast, double-deficiency for $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$ isoforms results in abnormalities along the entire tonotopic axis including profound deafness associated with stereocilia defects. In these mice, postnatal IHC synapse maturation is also impaired. In addition, the analysis of conditional versus global $G\alpha_{i3}$ -deficient mice revealed that the amplitude of ABR wave IV was disproportionately elevated in comparison to ABR wave I indicating that $G\alpha_{i3}$ is selectively involved in generation of neural gain during auditory processing. **Conclusion:** We propose a so far unrecognized complexity of isoform-specific and overlapping $G\alpha_i$ protein functions particular during final differentiation processes.

© 2018 The Author(s)
Published by S. Karger AG, Basel

Introduction

Heterotrimeric G-proteins are grouped into four subfamilies, i.e. $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$, and $G\alpha_{12/13}$ according to the nature of their α subunit, which also reflects their specificity for distinct G-protein-coupled receptors and sets of effector proteins [1, 2]. The three mammalian $G\alpha_i$ isoforms, i.e. $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, are best described as being the inhibitory $G\alpha$ subunits that suppress adenylyl cyclase activity resulting in decreased cellular cAMP levels [3-5]. In addition, specific binding partners such as members of the activators of G-protein signaling (AGS) family have emerged as crucial intracellular regulators that can control G-protein activity even in the absence of GPCR-stimulation. Until now, $G\alpha_i$ isoforms together with Gpsm2 (also known as AGS5, LGN), a group II AGS/guanine nucleotide dissociation inhibitor (GDI) [6, 7], have been implicated in signaling pathways that control mitotic spindle dynamics and thereby asymmetric cell division, polarity, growth and differentiation in invertebrates up to mammalian cells [8-12]. Initially, Gpsm2 was found in functional screens as a receptor-independent activator of G-protein-signaling interacting with GDP-bound $G\alpha_{i2}$ through its four $G\alpha_{i/o}$ -loco motifs [13, 14]. Subsequently, this interaction was demonstrated for all three $G\alpha_i$ isoforms at least *in vitro* [15]. Inhibiting $G\alpha$ protein function with the pan- $G\alpha_{i/o}$ -blocker PTX or *via* expression of an Atoh1-PTX construct demonstrated that $G\alpha_i$ and Gpsm2 control kinocilium migration and planar organization of stereociliary bundles in the hair cells of the murine cochlea [16, 17]. Gpsm2 dysfunction has been linked to mutations in the *GPSM2* gene in patients, formerly known as the deafness locus DFNB82, responsible for the autosomal recessive disorder Chudley-McCullough-syndrome [18, 19] that is characterized by severe to profound congenital hearing loss in humans [20-22]. Moreover, knock-out mice revealed that the deletion of the $G\alpha_{i3}$ isoform was sufficient to mimic the PTX phenotype in the immature pre-hearing organ by disrupting the migration of the kinocilium at the surface of hair cells and affecting hair bundle orientation and shape [16]. So far, $G\alpha_{i3}$ *per se* has not been associated with hereditary deafness because of an assumed functional $G\alpha_i$ isoform redundancy for hearing. Nevertheless, we and others recently reported hearing loss in $G\alpha_{i3}$ cKO and Atoh1-PTX mice, correlating with stereociliary elongation defects in IHCs [19, 23]. It remains open whether the ubiquitously expressed Gpsm2-binding partner $G\alpha_{i2}$ has also an impact on cochlear architecture and auditory function and whether both $G\alpha_i$ proteins play specific and/or redundant roles.

Here, we examined the physiological role of $G\alpha_i$ isoforms for hearing by using gene-targeted mouse lines for $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ and $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ and transgenic reporter mice expressing $G\alpha_{i3}$ -GFP. Comparative analyses of global versus conditional mutants that mainly delete in the inner ear and the telencephalon in combination with functional tests allowed us to dissect essential and redundant functions of different $G\alpha_i$ isoforms and to assign specific defects to outer or inner hair cells, the auditory nerve, satellite cells or central auditory neurons. We show that both $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$ act in a spatially and functionally complex manner not only on planar organization of hair cell bundles, but are also required for final differentiation

KARGER

of the first auditory synapse (the inner hair cell), and central neural gain during auditory processing. Therefore, hearing loss associated with dysfunction of specific G α isoforms is not only caused by abnormal stereociliary bundle or mitotic spindle organization but may also be a consequence of the disability for postnatal neuronal maturation and central adaptation.

Materials and Methods

Animals

Adult (1- to 8-month-old) mice weighing 15-35 g were included in this study. For all mouse lines, male and female animals were used, because we did not observe sex-dependent differences. The use, treatment and care of the animals and the experimental protocols were based on the institutional guidelines of the Veterinary Care Unit, University of Tübingen and were approved by the animal welfare commissioner of the regional board for scientific animal experiments in Tübingen (PH7/14). Experiments were performed according to the European Union Directive 86/609/EEC for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Mice were kept according to national guidelines for animal care in a specific-pathogen free (SPF) animal facility.

Gene targeting and mice

For generation of *Gnai3*^{fl/fl} mice, E14.1 embryonic stem (ES) cells from 129/Ola mice were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 2 mM glutamine (Seromed, Wien, Austria), leukemia inhibitory factor, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (Seromed), 50 μ M 2-mercaptoethanol (Invitrogen) and 15% heat-inactivated fetal bovine serum (Pan Biotech, Aidenbach, Germany). Genomic fragments flanking the murine *Gnai3* gene as well as *TK-neomycin* and *diphtheria toxin A (DTA)* were cloned into pBluescript (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) and fully sequenced. The targeting vector was designed according to the *Gnai3* knockout construct, where exon 6 is deleted [24]. Therefore, exon 6 of the *Gnai3* gene was flanked by loxP-sequences. At the 3' site, the loxP-flanked *TK-Neo* resistance cassette was inserted in reverse orientation in intron 6 of the *Gnai3* gene without deleting any endogenous sequence. Additionally, after the short arm, which encodes exon 7, a DTA cassette was inserted for the negative selection of ES cell clones (for all online suppl. material, see www.karger.com/doi/10.1159/000490867, suppl. Fig. 1). E14.1 ES cells were electroporated with the NotI-linearized targeting vector, and the transfected cells were subsequently subjected to G418 and Ganciclovir selection. Clones carrying the correct homologous recombination were identified by Southern blot hybridization with the 5' flanking probe (5'fp) indicated in (see online suppl. material) suppl. Fig. 1 after digestion of ES cell DNA with PstI (data not shown). Single integration was verified by digestion with BamHI and probing the Southern blot with the *neomycin* resistance cassette. Thereafter, the selected positive clones were transfected with Cre-recombinase to delete the loxP-flanked *TK-Neo* resistance cassette. Clones were selected by Ganciclovir treatment allowing for clones growing only when the *TK-Neo* resistance cassette was successfully excised. The selected clones were again checked with Southern blot hybridization with the internal probe P2 (3'fp2, see online suppl. material, suppl. Fig. 1A) after digestion with PstI (data not shown). Correctly targeted ES cell clones were injected into C57BL/6 blastocysts, which were transferred into pseudopregnant foster mice. Resulting chimeric mice were backcrossed to C57BL/6 mice, and germ line transmission of the targeted allele was again confirmed by Southern blot analysis. *Gnai3*^{fl/fl} mice were backcrossed to the C57BL/6 genetic background for at least five generations. Genotyping of *Gnai3*^{fl/fl} mice was performed by PCR with the following primers: 5'-GCAATTATCTTTTGTGTGGC-3' (Ex6-F); 5'-ATGCTGTCAAACAATTCATGC-3' (Ex7-R); 5'-TAGCAGTTGTCATGGCTACC-3' (Int-F) (see also online suppl. material, suppl. Table 1). The recombined allele results in a band of 350 bp (see online suppl. material, suppl. Fig. 1 B and C). To check successful deletion of *Gnai3*, mice were crossed with *Ella-Cre* mice and PCR analysis confirmed deletion of *Gnai3* (see online suppl. material, suppl. Fig. 1B and C). A specific deletion of *Gnai3* or *Gnai2* in the inner ear and telencephalon was achieved by crossing *Gnai3*^{fl/fl} or *Gnai2*^{fl/fl} mice and *Foxg1-Cre* mice. *Gnai2*^{fl/fl} mice were provided by the Comparative Medicine Branch of the National Institute of Environmental Health Sciences, North Carolina 27709 [25], backcrossed on a C57BL/6N background [26], and the *FoxG1-Cre* mouse line [27] was purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA), on a C57BL/6N background. A tissue-specific mutant mouse line was generated where both *Gnai*

KARGER

genes were disrupted by crossing with the *FoxG1-Cre* mouse line. *Gnai2^{fl/fl}*; *Gnai3^{fl/fl}*; *Foxg1-Cre^{fl/fl}* littermates were used as controls. Genotyping of *Gnai2^{fl/fl}* mice was performed by PCR with the following primers: for: 5'-GGCTATGATCCAAAACCTCCCCG-3' and rev: 5'-GTGGTAAGCCTGTGTTGTGAGAG-3'. The recombined allele results in a band of 420 bp (data not shown).

Gnai3-GFP mutant mice were generated in collaboration with Cyagen Biosciences and a more detailed description will be described elsewhere (Beer-Hammer *et al.*, in preparation). Briefly, the eGFP-cDNA was inserted in Exon 8 of *Gnai3* right after the TGA stop codon. To achieve equal expression of α_3 and eGFP the construct contains an IRES (internal ribosomal entry site). With this we achieve an equivalent expression of α_3 and GFP. The GFP expression was successfully detectable via flow cytometry (data not shown) and immunohistochemistry (this study). *Gnai3*-GFP mutant mice are born and grow without any obvious signs of abnormalities.

Organismal ("global") *Gnai*-deficient mice were originally provided by the Comparative Medicine Branch of the National Institute of Environmental Health Sciences, North Carolina 27709 on a genetic SV129 background [28]. Subsequently, the mouse strains were backcrossed on a C57BL/6N background for at least nine generations [26, 29]. The *Gnai2* mutant mouse line was kept in Individually Ventilated Cages (IVC), while the *Gnai3* mutant mouse line was kept under SPF conditions. Generation and initial characterization of global and conditional *Gnai2*- or global *Gnai3*-deficient mice is described in detail in [16, 24, 30].

Hearing tests

Hearing was tested on anesthetized animals through auditory brainstem response (ABR) measurements of the distortion product otoacoustic emissions (DPOAE), and electrocochleography. ABR to click and pure tone stimuli and the cubic 2*f1-f2 DPOAE for f2=1.24*f1 and L2=L1-10 dB were recorded in adult 1- to 8-month-old anesthetized mice. From click-evoked ABRs, consecutive wave components that reflect the summed neural activity along the ascending auditory pathway were analyzed as described [31-33]. *In vivo* electrocochleography (compound action potentials of the auditory nerve, CAP; summing potential of IHC receptor potentials, SP; receptor potential of OHCs, cochlear microphonic, CM) was performed in anesthetized mice as described [34]. From the waveform signal of the CAP and CM recordings, peak amplitudes (in mV) were calculated and plotted as input/output (I/O) functions with increasing stimulus level (0-100 dB SPL). For CM I/O function, peak-to-peak amplitudes were calculated for the stimulus frequency of 16 kHz, the stimulus frequency giving the best response. For SP, amplitude was defined as average DC potential minus baseline for stimulus frequency at 11.3 kHz.

SEM and measurements

The inner ear (cochlear and vestibular system) of mice aged P21 were harvested and immersed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.35, with 3mM CaCl2 for 24 h or more. The tissues were postfixed in 1% OsO4 in the same buffer, dissected and double processed with thiocarbonylhydrazide followed by OsO4 [35] before dehydration through an alcohol series and critical point drying with CO₂. After mounting on specimen support stubs, samples were sputter coated with platinum. Samples were examined with a JEOL 6700 F cold field emission scanning electron microscope operating at 3 or 5 kV. Measurements were made on the longest row of stereocilia closest to the kinocilium.

Stereocilia length was estimated in 20 (control) and 11 (*Gnai3* cKO) independent experiments in tissue samples from 4 control and 4 *Gnai3* cKO mice, respectively. Only if the length of at least 4 stereocilia could be determined, the value was considered for the statistical analysis. Stereocilia length could be derived from a total of 64 hair cells of control mice and 64 hair cells of *Gnai3* cKO mice. A total of 272 stereocilia and 305 stereocilia could be measured for control and *Gnai3* cKO mice, respectively. Stereocilia number per hair cell was counted in 12 and 14 independent experiments (countings) for 5 control and 4 *Gnai3* cKO mice, respectively. Each stereocilia counting included at least 4 hair cells. From a total of 87 and 106 hair cells from control and *Gnai3* cKO mice, a total of 8299 and 7621 stereocilia could be counted, respectively.

Images were collected from the basal or middle turn of the cochlea, defined as B20/30% and 50/60% of the total length of the organ of Corti from the base. At each location, the hair bundles were viewed both from behind the longest row of stereocilia to view the height of the hair bundle as well as approximately perpendicular to the apical surface of the HC or toward the inner aspect of the bundle to examine its overall morphology and composition. To estimate bundle height, measurements were made from images at calibrated instrument magnifications of 20,000 or occasionally 10,000. Although we might have underestimated the

actual stereocilia length, all efforts were taken to minimize the effect of parallax. Measurements were taken from bundles viewed from the lateral side toward the medial side (from the stria toward the modiolus), so that the row of longest stereocilia were imaged from the 'rear'. Samples were tilted and rotated so that the row of longest stereocilia was approximately perpendicular to the direction of view. Stereo-imaging was used in a few cases to gain an indication of possible errors in length measurements from 2D images. From the anaglyphs generated by a pair of images separated by 8 degrees of tilt, height measurements were obtained using analySIS software. These revealed little difference in the height measurement from that obtained from the 2D image of a stereocilium at close to perpendicular to its long axis. Measurements were made using ImageJ software.

Tissue preparation and Immunohistochemistry

Murine and rat cochlear tissues were prepared as whole-mounts or cryosections for the purpose of immunohistochemistry. Cochleae were isolated, fixed by immersion in 2% paraformaldehyde, 125 mM sucrose in 100 mM phosphate buffered saline, pH 7.4, for 2 h and then decalcified for 45 min in RDO rapid decalcifier (Apex Engineering Products Corporation, Aurora, IL, USA) as described [31, 36, 37], cryosectioned at 10 μ m and mounted on SuperFrost⁺/plus microscope slides (R. Langenbrinck Labor- u. Medizintechnik, Emmendingen, Germany) at -20°C . For whole-mount preparation, we dissected cochlear turns and mounted them on slides with the tissue adhesive Cell-Tek (BD Bioscience, Schwerte, Germany) in PBS and performed phalloidin labeling as described [38]. For immunohistochemistry and LacZ staining, mouse cochlear sections were stained as previously described [31, 37, 39]. BK (KCa1.1) (rb, Alomone Labs, Jerusalem, Israel), CtBP2/RIBEYE (rb, American Research Products, Waltham, MA, USA), KCNQ4 (rb, [40, 41], NF200 (ms), SK2 (rb), Kir4.1 (ms) all three from Sigma, otoferlin (ms, LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA), prestin (gt, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), Sox10 (gt, Santa Cruz biotechnology, Dallas, TX, USA), VAMP2 and brevicin (ms) from BD Bioscience and vGLUT1 (rb) both from Synaptic Systems (Göttingen, Germany), espin (ms, Fisher Scientific, Schwerte, Germany), $G\alpha_{11/12}$ and $G\alpha_{13}$ -specific antibodies [29], and GFP (rb, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) were used as primary antibodies for localizing the respective proteins in the inner ear, see also online suppl. material, suppl. Table 1. All commercial antibodies were used as recommended by the manufacturers. $G\alpha_{11/12}$ and $G\alpha_{13}$ -specific antibodies have been routinely validated with immunoblot and immunohistochemistry on wildtype and appropriate $G\alpha_i$ -deficient tissues [19, 29, 42]. For double labeling studies, both antibodies were simultaneously incubated for identical time periods. Hair cell stereocilia bundles were visualized by fluorescent phalloidin labeling of F-actin (Alexa Fluor 568 Phalloidin, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Sections and whole-mounts were viewed as described [43] using an Olympus BX61 microscope (Olympus, Hamburg, Germany) equipped with epifluorescence illumination. Images were acquired using an Olympus XM10 CCD monochrome camera and analyzed with cellSens Dimension software (OSIS GmbH, Münster, Germany). To increase spatial resolution, slices were imaged over a distance of 15 μ m within an image-stack along the z-axis (z-stack) followed by 3-dimensional deconvolution using cellSens Dimension built in algorithm.

Tissue preparation and Immunoblot

Liquid-frozen cerebellum and brain stem were homogenized in 500 μ l protein lysis buffer (20 mmol/l Tris, pH 8.3; 0.67% SDS; 238 mmol/l 2-mercaptoethanol; 0.2 mmol/l PMSF). To achieve electrophoretical separation of $G\alpha_i$ isoforms, separation was performed in gels containing 6 M urea. The proteins were visualized by immunodetection using the following primary antibodies described elsewhere [29] rabbit anti- $G\alpha_{11/12}$ (7.2 ng/ml), rabbit anti- $G\alpha_{13}$ (50 ng/ml). Finally, to visualize equal loading membranes were stained with Amido black.

Experimental Design and Statistical analysis

Data are presented as mean with standard deviation (SD) or mean with standard error of the mean (SEM). In the Figures, error bars are presented with and without caps for SD and SEM, respectively. Details for all statistical analyses are provided (see online suppl. material) in suppl. Table 2. In brief: differences of the mean were compared for statistical significance pair-wise by student's *t*-test (click-ABR thresholds in Fig. 1F and see online suppl. material, suppl. Fig. 2; ABR slope in Fig. 7B-C and see online suppl. material, suppl. Fig. 3B and C; loss of ABR threshold over age in Fig. 7D) or multiple comparisons 2-way ANOVA for factor "genotype" followed by post-hoc comparisons with Bonferroni's multiple comparison test (f-ABR in

KARGER

Fig. 1A-E; DPOAE thresholds and amplitudes in Fig. 2; electrocochleography in Fig. 5; ribbon counting in Fig. 6D; ABR amplitude I/O and latency I/O in Fig. 7B and C and (see online suppl. material) suppl. Fig. 3B and C; ABR wave IV/I ratios in Fig. 7E and (see online suppl. material) suppl. Fig. 3D. Fisher's exact test for associations was performed for 2x2 contingency tables (Fig. 1F, and stereocilia orientation in Fig. 3B). Non-parametric Mann-Whitney test was used to compare for statistical significance of stereocilia number and length in Fig. 3E and (see online suppl. material) suppl. Table 3. Unless otherwise noted, statistical significance was tested at the level of 5%. Level of significance is illustrated in the Figures with symbols or shaded areas (n.s. $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) and depicted in (see online suppl. material) suppl. Table 2. For Student's t-test, 2-way ANOVA Graph by Mann-Whitney test, and Kruskal-Wallis test Pad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA) was used. For the Fisher's exact test the online tool of vassarstats (<http://vassarstats.net/tab2x2.html>) was used.

Results

Isoform-specific and redundant roles of $G\alpha$ proteins for high- and low-frequency hearing and hair bundle organization

The functional consequences of deficiency for different $G\alpha$ isoforms for auditory responses was explored by special hearing tests. The auditory brainstem response (ABR) was measured in response to click and pure tone auditory stimuli in 1- to 3-month-old mice with global (g) or conditional (c) absence of $G\alpha_{12}$ and/or $G\alpha_{13}$. Conditional mouse mutants lacking one or both isoforms were generated by Cre-driven recombination using the Foxg1 promoter [27]. *Gnai2* gKO (Fig. 1A) and *Gnai2* cKO (Fig. 1B) mice both displayed tone-burst evoked ABR thresholds (f-ABR) and click-evoked ABR thresholds (Fig. 1F, click-ABR) similar to controls, suggesting that $G\alpha_{12}$ is either dispensable for hearing or may be functionally substituted by remaining $G\alpha_{13}$ isoforms. In contrast, *Gnai3* gKO (Fig. 1C) and *Gnai3* cKO (Fig. 1D) mice demonstrated a significant elevation of f-ABR and click-ABR thresholds towards higher frequency regions. This suggests a selective role of $G\alpha_{13}$ particularly for these frequencies, which cannot be rescued by $G\alpha_{12}$. In order to identify

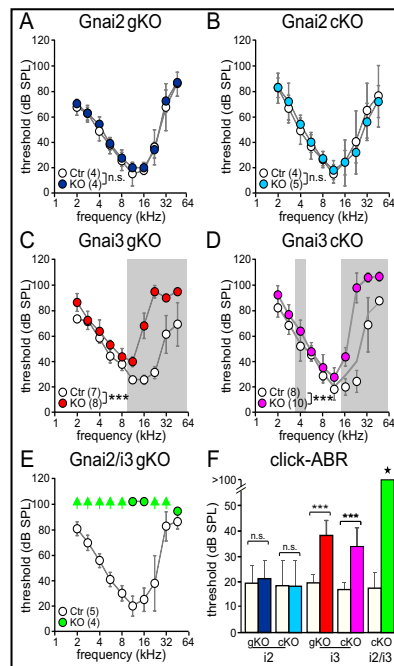


Fig. 1. ABR thresholds of gene-targeted *Gnai* KO mice. (A-E) Frequency tone-burst-evoked ABR (f-ABR) thresholds, mean \pm SD from 4 to 8 mice (number of ears in brackets). (A,B) Frequency tone-burst-evoked ABR thresholds were not affected in (A) global (gKO) and (B) tissue-specific (cKO) *Gnai2* KO mice. (C,D) High-frequency loss occurs in (C) *Gnai3* gKO and (D) cKO. ABR thresholds in *Gnai3* gKO and cKO are significantly elevated for stimulation frequencies above 8 kHz (shaded areas, $p < 0.05$). (E) Profound ABR threshold loss was found in *Gnai2/i3* cKO mice over all stimulus frequencies. Arrows indicate ABR thresholds exceeding the maximum tested stimulus level. (F) Click-evoked ABR (click-ABR) thresholds for the mice mutants (global deletion of *Gnai2*, dark blue, conditional deletion of *Gnai2*, light blue, global deletion of *Gnai3*, red, conditional deletion of *Gnai3*, purple, conditional double deletion of *Gnai2/i3*, green) vs. their respective controls (white). n.s. not significant, "star" $p < 0.05$, "****" $p < 0.001$. Detailed statistic is depicted in (see online suppl. material) suppl. Fig. 2 and suppl. Table 2.

overlapping functions between Gα₁₂ and Gα₁₃, we next analyzed mice defective for both genes. As mice with a global deficiency for both *Gnai2* and *Gnai3* are embryonic lethal [29] we generated conditional *Gnai2/i3* cKO mice that were viable and allowed inspection of hearing functions in the adult animal. Rather unexpectedly, *Gnai2/i3* cKO mice were profoundly deaf (Fig. 1E) with click-ABR thresholds that consistently exceeded 100 dB sound pressure level (SPL, root mean square weighted for click stimuli, SPL_{rms}) (Fig. 1F and see online suppl. material, suppl. Fig. 2). Indeed, in comparison to *Gnai2/i3* cKO mice the hearing thresholds of global and conditional *Gnai3* mutants were only significantly elevated while that of global or conditional *Gnai2* mutants were normal (Fig. 1F and see online suppl. material, suppl. Fig. 2).

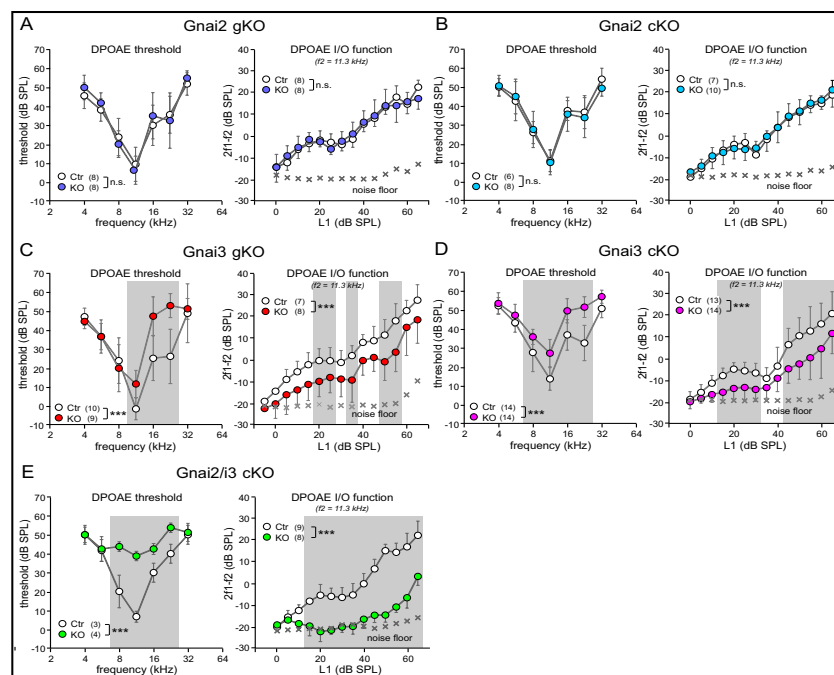


Fig. 2. DPOAE thresholds and DPOAEs amplitude I/O function in *Gnai2* and *Gnai3* gene-targeted mice. (A,B) OHC function in global and tissue-specific *Gnai2* KO is not impaired. Mean±SD DPOAE thresholds (left panels) and DPOAEs amplitude I/O function evoked by stimulus f₂=11.3 kHz (right panels) above noise floor (crosses) for *Gnai2* gKO (A, KO) and *Gnai2* cKO mice (B, KO) and their respective controls (Ctr) are similar. (C,D) Impairment of OHC function at high-frequency regions in global and tissue-specific *Gnai3* KO mice. Mean±SD DPOAE thresholds (left panels) and DPOAEs amplitude I/O function (right panels) for *Gnai3* gKO (C) and *Gnai3* cKO mice (D), and their respective controls. DPOAE thresholds for stimulation frequencies above 8 kHz are significantly elevated and DPOAE amplitudes were significantly reduced in KO mice compared to the respective controls. (E) OHC function is lost in *Gnai2/i3* cKO mice. Mean±SD DPOAE thresholds (left panels) and DPOAEs amplitude I/O function evoked by stimulus f₂=11.3 kHz (right panels) for *Gnai2/i3* cKO and their respective controls. Remarkable loss of thresholds at most testing frequencies and reduction of amplitudes are evident. Grey-shaded areas represent statistically significant post-hoc comparisons with p<0.05 after Bonferroni corrections. “n.s.” and “***” indicate level of statistical significance p>0.05 and p<0.001, respectively. Data points represent the mean of 6 to 14 ears (numbers in brackets close to legend key) from 4 to 7 mice (A-D) and 3 to 4 ears from 2 mice (E).

To validate the specific contribution of outer hair cells (OHCs) to this hearing threshold difference in *Gnai* mutant mice, distortion product otoacoustic emissions (DPOAE) thresholds were measured as a metric of intact OHC mechano-electrical response [44]. As expected from normal ABR thresholds seen in *Gnai2* gKO and *Gnai2* cKO mouse models (Fig. 1A and B) normal input/output (I/O) functions of emission amplitudes evoked by stimulus frequency $f_2=11.3$ kHz were also observed in both *Gnai2* KO lines (Fig. 2A and B). Global (Fig. 2C) and conditional (Fig. 2D) *Gnai3* KO mice had significantly elevated DPOAE thresholds at test frequencies from 8 to 22.6 kHz (Fig. 2C and D, left panel) and exhibited reduced emission amplitudes at $f_2=11.3$ kHz (Fig. 2C and D, right panel). Both observations indicate that the elevated hearing thresholds in these *Gnai* mouse mutants (Fig. 1C and D) are related to impaired mechano-electrical OHC properties in high-frequency cochlear regions.

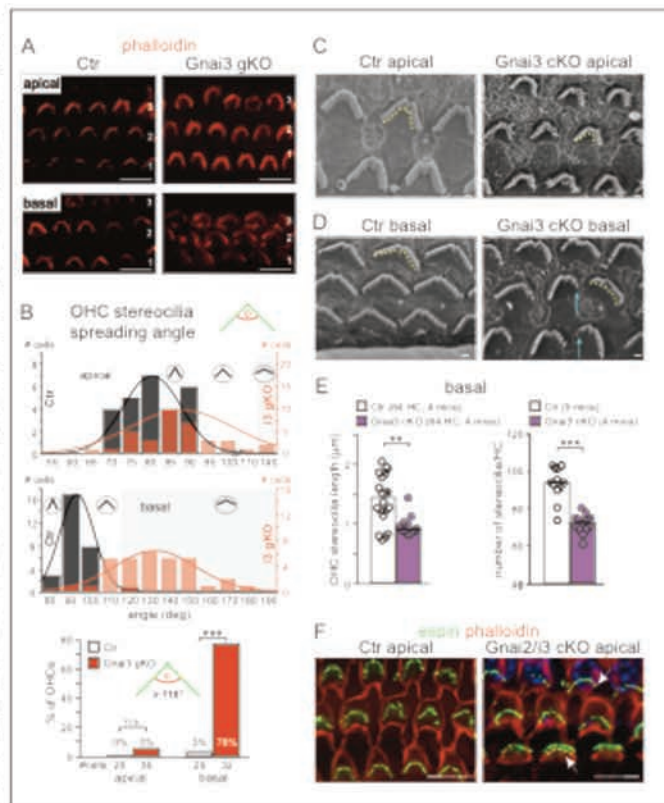
In contrast to single *Gnai2* KO and *Gnai3* KO, *Gnai2/i3* cKO mice displayed residual DPOAEs only for the highest stimulus intensities at $f_2=11.3$ kHz with significantly reduced emission amplitudes (Fig. 2E). This indicates that both $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ are essential for hearing and that $G\alpha_{12}$ can functionally replace $G\alpha_{13}$ in low frequency but not in high frequency regions.

Furthermore, to specify the role of $G\alpha$ for hair bundle organization we next examined the shape of OHC hair bundles in young *Gnai3* gKO mice around hearing onset (P11-12) by using phalloidin staining to visualize actin in stereocilia (Fig. 3A) and categorized their shape in terms of the angle between the hair bundle arms (Fig. 3B). A significantly higher number of OHCs with wider V-shaped stereociliary bundles exceeding 110° was found in basal (high-frequency) cochlear turns of *Gnai3* gKO compared to control mice whereas the visible differences were statistically insignificant in apical (low-frequency) cochlear turns. The quantification is shown in lower panel of Fig. 3B. Scanning electron microscopy, performed in cochlear samples obtained at P21 from *Gnai3* cKO confirmed abnormal bundles in basal but no obvious anomaly in apical (low-frequency) cochlear turns were found (Fig. 3C and D). Additionally, there were shorter and fewer stereocilia on OHCs in basal cochlear turns of *Gnai3* cKOs (Fig. 3E and see online suppl. material, suppl. Table 3). *Gnai2/i3* double-deficiency induced hair bundle shape abnormalities also in the apical cochlear turn (Fig. 3F) as shown by fluorescence microscopy using phalloidin and espin as stereocilia markers.

Next, we examined if the hair bundle abnormalities are linked to expression profiles of the different $G\alpha$ isoforms. These abnormalities were restricted to higher frequency regions in *Gnai3* cKO mice whereas they extended over high and low frequency regions in *Gnai2/i3* cKO mice. The expression profiles of $G\alpha_{12}$ (Fig. 4A and B) and $G\alpha_{13}$ (Fig. 4C and D) were analyzed by immunohistochemistry in whole-mount preparations of the rat cochlea. At P2, $G\alpha_{13}$ was detected in inner hair cell (IHC) and OHC hair bundles throughout the cochlear length, while $G\alpha_{12}$ immunoreactivity was restricted to the apical turn (Fig. 4A and C). At P10, both $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ expression was evident in the apical turn, while $G\alpha_{13}$ dominated mainly in the basal turn (Fig. 4B and D). The strong expression of $G\alpha_{13}$ in hair bundles in basal high-frequency cochlear turns and the co-expression of $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ in hair bundles in apical lower-frequency cochlear turns thus support the idea that $G\alpha_{12}$ does not substitute for *Gnai3*-deficiency in basal cochlear turn, which may explain the distinct hearing deficits in *Gnai* mouse mutants.

Abnormal hair bundle elongation in the *Gnai3*-deficient mice may lead to hearing deficits through dysfunctional mechano-electrical transduction (MET). The functionality of MET and the electrical potential from the subsequent initiated synchronous activation of the auditory nerve fibers can be captured by the steepness with which sound-induced compound action potentials of the auditory nerve (CAP) increase to escalating sound intensities and CAP threshold [45, 46]. To address if a disruption of stereociliary bundle elongation in *Gnai3* KO would impact the functionality of MET channels, we measured sound-induced CAP responses in age-matched *Gnai3* cKO and control mice. Best CAP thresholds of about 20 dB SPL at 11.3 kHz were found in control mice, and the growth functions for this stimulus frequency are shown in Fig. 5A. *Gnai3* cKO mice had significantly elevated CAP thresholds of >35 dB SPL and the CAP amplitude growth points to disturbed transduction of sound-induced mechanical signals (Fig. 5A). On average, the CAP amplitude reduction in *Gnai3* cKO mice was larger at

Fig. 3. Stereociliar configuration of OHCs in apical and basal cochlear turns from gene-targeted *Gnai3* KO mice. (A) Phalloidin staining of control (Ctr, left panel) and *Gnai3* gKO (right panel) OHC stereocilia bundles in P11-12 whole-mount cochlea for both cochlear turns. Scale bars 10µm. 3,2,1-OHC row. One representative animal of n=4-8 is shown. (B) Gaussian distribution of OHC stereocilia spreading angle for control (black) and *Gnai3* gKO (red). *Gnai3* gKO have significantly shallowed V-shaped bundles ($\Phi > 110^\circ$) in basal turn OHCs, depicted by shaded area and encircled wide-spread chevron icons. Upper panel, OHCs from apical cochlear turn. Middle panel, OHCs from basal cochlear turn. Curves illustrate a fit of normal distribution for either group, ordinate gives absolute number of cells. Lower panel, quantification of OHCs with $\Phi > 110^\circ$ (%).



Lower panel, quantification of OHCs with $\Phi > 110^\circ$ (%). (C, D) Scanning electron microscopy of apical and basal stereocilia from control and *Gnai3* cKO mice confirms normal hair bundle shape in apical cochlear turn (C) and the disorganized ultrastructure of OHC bundles from basal turns of *Gnai3* cKO (D). Hair bundle shape is outlined in yellow. Blue arrows point to asymmetrically shaped bundles. Scale bars, 1µm. One representative animal of n=3 is shown. (E) Significantly reduced stereocilia length (left panel) and number (right panel) in basal cochlear turn of *Gnai3* cKO mice. Stereocilia length was assessed in 20 (Ctr) and 11 (*Gnai3* KO) independent experiments (depicted as individual dots) in tissue samples from 4 control and 4 *Gnai3* KO mice. Stereocilia length was derived from a total of 64 hair cells of control mice and 64 hair cells of *Gnai3* KO mice. A total of 272 stereocilia and 305 stereocilia could be measured for control and KO mice, respectively. Stereocilia number per hair cell was counted in 12 and 14 independent experiments (countings depicted as dots) for 5 control and 4 *Gnai3* KO mice, respectively. From 87 and 106 hair cells from control and *Gnai3* KO mice, a total of 8299 and 7621 stereocilia could be counted, respectively. Stereocilia number ranged from 72-119 in control mice and 46-86 in *Gnai3* KO mice. For both parameters median and single values are depicted. **** and ***** indicate level of statistical significance $p = 0.0107$ and $p < 0.0001$, respectively. (F) Phalloidin (red) and espin (green) staining of *Gnai2/3* cKO OHC indicate abnormal bundle shape in apical low-frequency turns. Scale bars 10µm.

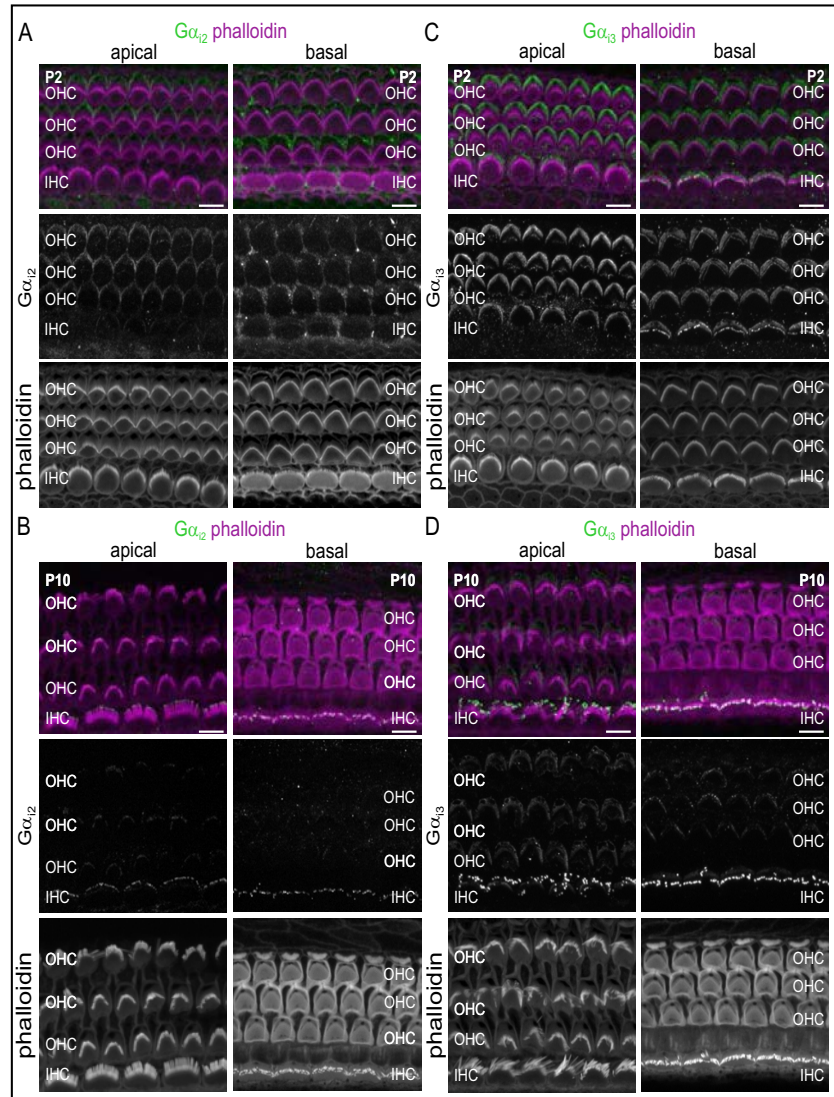


Fig. 4. G α_{12} and G α_{13} expression in the inner ear. (A-D) Surface view of whole-mount preparations of rat cochleae at P2 and P10. (A, B) G α_{12} and (C, D) G α_{13} labeling (green in upper panel and white in middle panel) in the actin-rich hair bundles labeled by phalloidin (purple in upper panel and white in lower panel). (A, C) At P2, G α_{12} (A) and G α_{13} (C) localizes at the tip of the OHC hair bundles in apical but only G α_{13} in basal cochlear turns, whereas (B, D) at P10 G α_{12} (B) and G α_{13} (D) stains in IHCs in the apical but only G α_{13} in the basal turn. Scale bars 7 μ m. One representative animal of n=5 is shown.

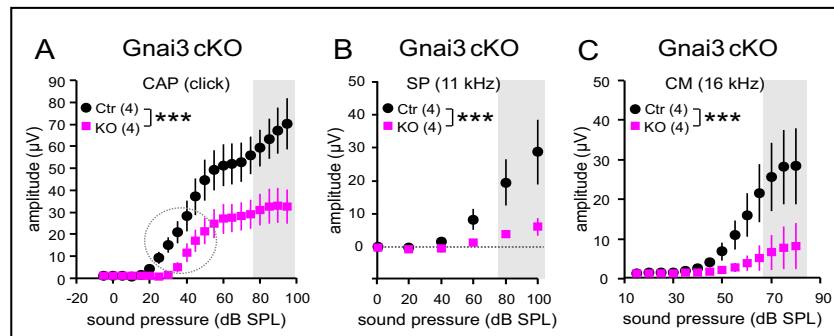


Fig. 5. Electrocochleography from gene-targeted *Gnai3* KO mice. (A-C) Electrocochleographic responses of *Gnai3* cKO mice are reduced by >2-fold confirming that the reduced cochlear output has its origin already at the receptor level (hair cell potentials). (A) Compound action potentials (CAP) - response from the auditory nerve. The circle highlights the similar slope of close-threshold CAP response growth. (B) Summating potentials (SP) - deterrent potential from all hair cells. (C) Cochlear microphonics (CM) - receptor potential of OHCs. Mean \pm SEM of 4 ears (4 mice). Differences of CAP, SP, and CM responses reach statistical significance at high stimulus levels (≥ 70 dB SPL, shaded areas, $p < 0.05$, post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test). *** $p < 0.001$ for differences in factor genotype (2-way ANOVA for repeated measurements). Detailed statistic is depicted in (see online suppl. material) suppl. Table 2.

frequencies ≥ 16 kHz ($\sim 80\%$) than at lower frequencies ≤ 4 kHz ($\sim 50\%$) in comparison to age-matched controls (these growth functions are not shown as extra Figures). Moreover, the CAP responses were (right-)shifted to higher sound pressure levels in *Gnai3* cKO mice, albeit with similar steepness of amplitude growth (slope) with thresholds up to 50 dB SPL compared to control mice (Fig. 5A, CAP, encircled). Hence, mechano-electrical currents in *Gnai3* cKO are likely to be functional in a limited response range but their sensitivity for activation seems to be impaired in high-frequency regions.

Failed activation of intact MET currents in high-frequency regions of *Gnai3* cKO mice was also confirmed by a barely detectable summation potential (SP) amplitude, that was recorded in *Gnai3* cKO mice at the round window for 11.3 kHz tone bursts as an estimate of whether MET channel currents are impaired [47] (Fig. 5B, SP). Again, SP amplitude reduction was larger at higher ($\sim 70\%$ at 16 kHz) than at lower or middle frequencies ($\sim 50\%$ at 4-8 kHz) (the growth function is not shown as extra Figure). This assumption is supported by a failure to generate cochlear microphonic (CM) amplitudes upon increasing sound pressure levels in *Gnai3* cKO mice (Fig. 5C, CM). CM amplitudes are assumed to be proportional to the number of functional phasic MET currents from mainly basal-coil OHCs [48]. Overall, these findings support hampered activation of functional MET currents in high-frequency cochlear turns of *Gnai3* cKO mice to be causally related to hearing and hair bundle abnormalities.

In conclusion, a close structural/functional relationship between impaired stereocilia elongation upon *Gnai* deletion and impaired auditory responses is supported by (i) an overlap of hearing function deficit and $G\alpha_i$ expression patterns in either higher frequency ($G\alpha_{i3}$) or lower frequency cochlear regions ($G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$), and (ii) impaired CAP, SP and CM function in *Gnai3* cKO towards higher frequencies.

Specific $G\alpha_{i2/i3}$ functions during maturation of IHC synapses

To obtain insight if the presumably impaired activation of MET currents might influence the maturation process of the hair cell phenotype in the high-frequency cochlear turn (*Gnai3* cKO) or in all cochlear turns (*Gnai2/i3* cKO) we inspected key biomarkers for hair cell maturation (Fig. 6). The motor protein prestin (Fig. 6A, left panel, green) and

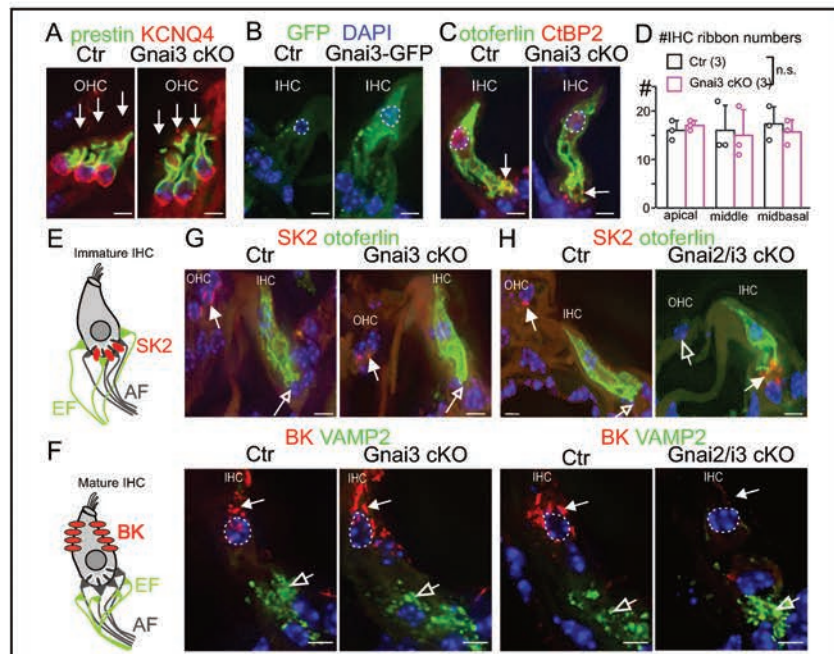


Fig. 6. α_{12} and α_{13} exhibit mutually redundant functions for IHC but not OHC differentiation. (A) Immunostaining of OHC functional markers KCNQ4 and prestin along the cochlear turns of 7- to 8-week-old control (Ctr) and *Gnai3* cKO mice. No obvious differences of KCNQ4 (red) and prestin (green) expression are observed in OHCs from control and *Gnai3* cKO mice as exemplified for high-frequency cochlear regions. One representative animal of $n=5-7$ is shown. (B) GFP expression in IHCs of 4-week-old *Gnai3*-GFP reporter mice confirming α_{13} expression, whereas GFP is not detectable in IHCs of control littermates. One representative animal of $n=2$ is shown. (C) Immunostaining of CtBP2/RIBEYE (red) and otoferlin (green) in basal cochlear turn of 7- to 8-week-old control and *Gnai3* cKO IHCs. No obvious differences in CtBP2/RIBEYE and otoferlin expression are observed between control and KO mice. One representative animal of $n=2-4$ is shown. (D) No significant difference in mean IHC ribbon counts \pm SD of 7- to 8-week-old control and *Gnai3* cKO mice. Circles represent ribbon counts for individual animals ($n=3$ ears from 3 mice). (E, F) Schematic illustration of localization of SK2 and BK in immature (E) and mature (F) IHCs. (G) Normal otoferlin (green), BK (red), and VAMP 2 (green) immunostaining and expected lack of SK2 (red) in IHCs in basal cochlear turns of 7- to 8-week-old *Gnai3* cKO mice ($n=2-3$ mice). (H) Immunostainings show immature SK2 expression and missing BK expression in 7- to 8-week-old *Gnai2/i3* cKO IHCs ($n=1-2$ mice). (G, H) Otoferlin is used as IHC marker. VAMP2 stains efferent nerves. Circles indicate nuclei of IHCs. (G, H upper panel). Closed arrows indicate localization of SK2 in immature IHCs and open arrows indicate SK2 expression in OHCs. (G, H lower panel) Closed arrows indicate BK staining and open arrows indicate VAMP 2 staining. Scale bars, 10 μ m.

the voltage-gated K⁺-channel KCNQ4 (Fig. 6A, left panel, red) are typically upregulated in OHCs before hearing onset [49-52] and remain expressed in the mature cochlea. In mature *Gnai3* mutants' OHCs both marker proteins were expressed as expected suggesting normal development (Fig. 6A, right panel). Analyzing GFP fluorescence in *Gnai3*-GFP reporter mice indicated that α_{13} protein should be expressed in IHCs (Fig. 6B). Nevertheless, *Gnai3* cKO mice showed a normal expression profile of the Ca²⁺-sensor protein otoferlin within the IHC [53] (Fig. 6C, green) with a regular distribution pattern (Fig. 6C, red) and no indication for

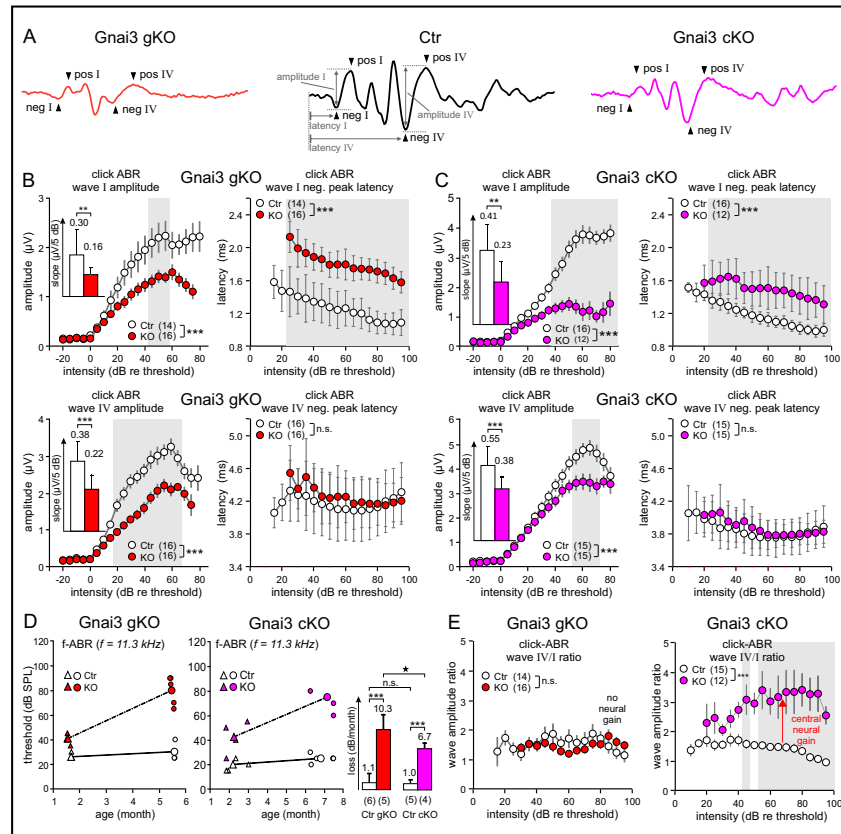


Fig. 7. ABR amplitudes, latencies, wave IV to wave I amplitude ratios, and ABR thresholds change over age in global and conditional *Gnai3* KO mice. (A) Individual ABR waveform from control (Ctr, black) and *Gnai3* KO (red and purple line) 1- to 3-month-old mice with indicated wave I and wave IV peak-to-peak amplitude (amplitude) and leading peak latency (latency). (B,C) ABR wave I (upper panels) and IV (lower panels) amplitude/I/O functions (left panels) with slope (insets) and wave I and IV leading peak latency I/O function (right panels) for *Gnai3* gKO (B), *Gnai3* cKO (C) and respective control mice. Decrease of amplitudes, amplitude slope and increase of wave I latencies are evident in the KO mice (shaded areas, $p < 0.05$). (D) Age-related loss of ABR thresholds to 11.3 kHz stimuli for *Gnai3* gKO and *Gnai3* cKO mice at the age of 1-3 months (triangles) and 5-7 months (circles). Progression of threshold loss occurs in both KO mouse lines (dashed lines). The loss of ABR thresholds per month of age in *Gnai3* KO mice significantly exceeded the loss in control mice (graph bars). The loss of ABR threshold per month was significantly larger in *Gnai3* gKO mice than in *Gnai3* cKO (star, $p < 0.05$), and not significantly different between both control groups (n.s.). Thresholds for individual ears are denoted by small symbols. (E) ABR wave IV/I ratios for *Gnai3* gKO, *Gnai3* cKO and respective control mice. Significant elevation of wave IV/I ratios at middle to high stimulation levels is found only in *Gnai3* cKO mice. Mean \pm SEM (straight error bars) or SD (error bars with caps) from 4 to 9 mice (number of ears in brackets).

an altered number (Fig. 6D) of CtBP2/RIBEYE protein-labeled ribbon structures, though the statistical conclusion may be limited by the small sample size. Furthermore, a characteristic feature of immature IHCs during normal development is the formation of an axosomatic

contact of efferent nerve fibers with the small conductance Ca^{2+} -activated K^+ -channel type 2 (SK2) at the base of IHCs [54-56] (Fig. 6E). With hearing onset (P11-12), a reorganization of axosomatic efferent nerves on IHCs occurs that is characterized by downregulation of SK2 and upregulation of BK, both Ca^{2+} - and voltage-gated K^+ -channels (Fig. 6F). BK channels carry I_{Kf} currents that are essential to transform immature IHCs (exhibiting spontaneous Ca^{2+} -spikes) to mature functional cells that are then able to respond to sound [57, 58]. *Gnai3* cKO IHCs innervated by VAMP 2 positive efferent nerves mature normally, i.e. lacking SK2 at the base of otoferlin-positive cells (Fig. 6G, upper panel) and normal BK expression in supranuclear position on IHCs (Fig. 6G, lower panel). In contrast, in *Gnai2/i3* cKO IHCs an immature phenotype was observed along the entire tonotopic axis, characterized by a persistent expression of SK2 (Fig. 6H, upper panel) and a lack of BK expression (Fig. 6H, lower panel) at the basal pole of IHCs. Since *Gnai2* KO mice show no IHC maturation defects and IHCs from *Gnai3* cKO mice develop normally in spite of hair bundle defects, whereas IHCs from *Gnai2/i3* cKO remain in an immature stage, we conclude that $G\alpha_{12}$ or $G\alpha_{13}$ function is required for final maturation of IHC synapses prior to hearing onset.

Function of $G\alpha_{13}$ in the central auditory pathway correlates with its expression in satellite cells and brainstem auditory nuclei

Although IHCs mature normally in *Gnai3* KO mice their hair bundles are defective (see Fig. 3B-E) and functionally impaired (see Fig. 1C,D,F), and the cochlear output is diminished (see Fig. 5). Therefore, we were interested whether central auditory processing is also affected and studied supra-threshold ABR wave amplitudes, which reflect the summed activity of the auditory nerve independent of OHC contribution to hearing thresholds.

Whereas *Gnai2* cKO mice showed normal early (ABR wave I) and late (ABR wave IV) amplitudes and latencies in response to click sound stimuli (see online suppl. material, suppl. Fig. 3), supra-threshold ABR wave I amplitudes were significantly reduced in both *Gnai3* gKO (Fig. 7A and B) and *Gnai3* cKO mice (Fig. 7A and C) in comparison to controls. In addition, the slopes of the amplitude growth functions were significantly weaker as compared to controls (Fig. 7B and C, inset left panels). Moreover, a significant delay of the leading peak of ABR wave I that recovered towards ABR wave IV became apparent (Fig. 7B and C, right panels). Reduced amplitude and response delay are consistent with the observed diminished cochlear output as we think is a consequence of impaired activation of IHC MET channels. This was accompanied by an accelerated threshold loss over age observed in ABRs at a stimulation frequency of 11.3 kHz (and thresholds of DPOAE at $f_2=11.3$ kHz, not shown) as seen in individual mice at different age, i.e. 1.5-3 months vs. 5.4-7.5 months (Fig. 7D). The rate of loss of ABR thresholds per month of age in *Gnai3* KO mice exceeded significantly the minor loss seen in control mice (Fig. 7D, bar graphs). Furthermore, the progression of ABR threshold loss was significantly stronger in global *Gnai3* KO mice when compared to mice with conditional *Gnai3* deletion (Fig. 7D, bar graph) while no significant difference was found when comparing the progression for the respective controls (Fig. 7D, bar graph).

Strikingly, the amplitude of ABR wave IV was disproportionately elevated in comparison to ABR wave I in *Gnai3* cKO mice but not in *Gnai3* gKO (Fig. 7E), indicating that conditional deletion of *Gnai3* mainly restricted to the inner ear preserves a capacity to generate neural gain, while this function is mostly lost in global *Gnai3* KO mice. In *Gnai2* KO mice showing normal hearing and in *Gnai2/i3* cKO being almost deaf this effect was not further analyzed. The different capabilities of global and conditional *Gnai3* KO to generate central neural gain suggested that distinct $G\alpha_{13}$ expression patterns might be causally involved in the progression of the deviating functional phenotypes. Isoform-specific antibodies detected $G\alpha_{13}$ proteins in the brainstem and cerebellar tissues from control but not from *Gnai3* gKO mice (see online suppl. material, suppl. Fig. 4, upper panel), whereas in the same tissues $G\alpha_{11/12}$ immunoreactivity was unaffected (see online suppl. material, suppl. Fig. 4, middle panel). We next searched for differences in the expression pattern of $G\alpha_{13}$ between *Gnai3* gKOs and *Gnai3* cKOs in retrocochlear regions possibly involved in neural gain generation at the level of the auditory nerve or its target neurons in the cochlear nucleus [59, 60].

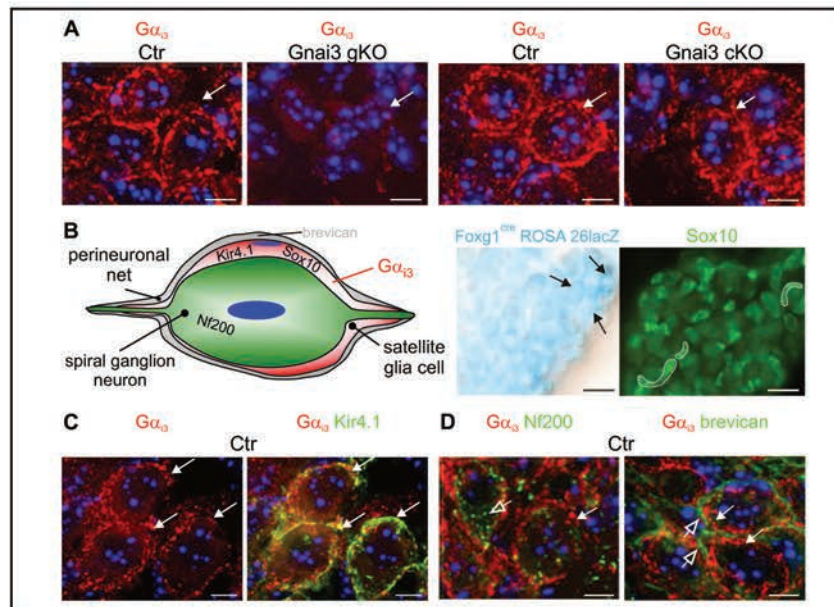


Fig. 8. Expression of $G\alpha_{13}$ in the spiral ganglion. (A) Sections through the spiral ganglion stained with $G\alpha_{13}$ antibodies reveal its presence in control (Ctr) and *Gnai3* cKO mice but not in *Gnai3* gKO mutants. One representative animal of $n=2$ is shown. Scale bars, $5\mu\text{m}$ (B) Schematic illustration of the expected Nf200, Kir4.1, Sox10, brevicane, and $G\alpha_{13}$ immunoreactivity in the soma of a single spiral ganglion neuron and the ensheathing satellite (glia) cell, and the surrounding perineuronal net matrix. Lac Z staining of Foxg1^{Cre}/ROSA 26 reveals activity of Cre in the cytoplasm of spiral ganglion neurons (middle panel, some somas are indicated with arrows) but not in neighboring Sox10-labelled satellite cells (right panel, some cells are indicated with white outlines). Scale bars, $15\mu\text{m}$. One representative animal of $n=2$ is shown. (C, D) Sections through the spiral ganglion co-labelled with $G\alpha_{13}$ and Kir4.1 antibodies confirm its presence in satellite cells surrounding Nf200 positive spiral ganglion neurons. $G\alpha_{13}$ itself is surrounded by the perineuronal marker brevicane. Scale bars, $5\mu\text{m}$. One representative animal of $n=2-5$ is shown.

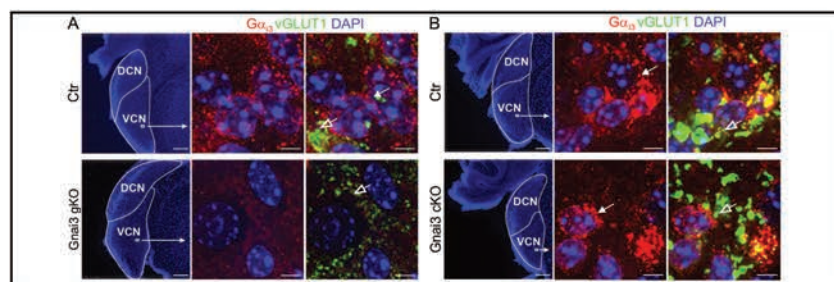


Fig. 9. $G\alpha_{13}$ and vGLUT1 expression in the ventral cochlear nucleus. (A,B) Left panels: Overview of cross sections showing dorsal (DCN) and ventral (VCN) cochlear nucleus of *Gnai3* gKO (A) and *Gnai3* cKO (B) and corresponding controls (Ctr). Scale bars $200\mu\text{m}$. Middle and right panels: stained with $G\alpha_{13}$ -specific antibodies (red) and the vesicular-glutamate-transporter-1 (vGLUT1, green). Note the absence of $G\alpha_{13}$ labeling contacted by vGLUT1 in *Gnai3* gKO (A) but not cKO (B). One representative animal of $n=2$ is shown. Scale bars $5\mu\text{m}$.

At the level of the spiral ganglion neurons (SGN) $G\alpha_{13}$ immunoreactivity was absent in *Gnai3* gKO but not in *Gnai3* cKO mice (Fig. 8A). Also in target neurons of the auditory nerve in the cochlear nucleus (e.g. the bushy cells in the ventral cochlear nucleus, VCN), which are identified through vGLUT1 positive presynaptic contacts (Fig. 9, green) [61], $G\alpha_{13}$ antibody staining was detected in *Gnai3* cKO (Fig. 9B, red) but not in *Gnai3* gKO mice (Fig. 9A, red). Moreover, preliminary findings revealed reduced vGLUT1 staining intensity in *Gnai3* gKOs (Fig. 9A, green) in comparison to *Gnai3* cKO mice and control mice (Fig. 9B, green). As previously described reduced vGLUT1 expression goes along with reduced activity [61], we suggest differences in vGLUT1 activity of auditory nerves between both *Gnai3* mutants.

To search for additional differences between *Gnai3* gKO and *Gnai3* cKO mice we compared the expression pattern of $G\alpha_{13}$ with that of the Cre activity generated by the Foxg1^{cre/+} line used to generate *Gnai3* cKO mice. Lac Z staining of Foxg1^{cre/+}ROSA 26 animals showed Cre activity in the ball-shaped SGNs (Fig. 8B, middle panel) which correspond to the previously described expression of Foxg1 [27]. $G\alpha_{13}$ expression was assigned to the bean-shaped supporting satellite cells, which were characterized by Sox10 expression (Fig. 8B, right panel) and colabelling with the marker Kir4.1 [62, 63] (Fig. 8B and C) surrounding the Nf200 positive SGNs (Fig. 8B and D, left panel). Furthermore, $G\alpha_{13}$ expression itself was encircled by the perineuronal net marker brevican [64] (Fig. 8B and D, right panel). Importantly, expression of $G\alpha_{13}$ in satellite cells is evident in *Gnai3* cKO but not in *Gnai3* gKO mice and hence could contribute to auditory neural gain only seen in *Gnai3* cKO.

Taken together, our findings have various implications on the role of $G\alpha_i$ proteins as regulators of auditory functions and can be summarized by four key observations (Fig. 10). (1) Hair bundles in low-frequency regions are shaped by $G\alpha_{12}$ and/or $G\alpha_{13}$ whereas their correct formation in high-frequency regions only depends on $G\alpha_{13}$ (Fig. 10A). (2) At least one $G\alpha_i$ isoform is required to trigger the final maturation of IHC synapses (Fig. 10B). (3) In low-frequency regions the deletion of either $G\alpha_{12}$ or $G\alpha_{13}$ has no hearing phenotype, whereas in high-frequency regions $G\alpha_{13}$ is required for appropriate hearing (Fig. 10C). (4) Expression of $G\alpha_{13}$ in satellite cells of the cochlea and/or auditory neurons in the brainstem associates with neural gain adjustment (Fig. 10D).

Discussion

The present study unravels specific auditory functions of different $G\alpha_i$ proteins, the binding partners of Gpsm2, which are known as evolutionary highly conserved determinants of cell polarity, asymmetric cell division, or planar cell polarity [11, 42]. The present data provide evidence to discriminate between so far elusive functions of $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ for (1) shaping polarity and length of hair bundles in different cochlear regions, and (2) also uncover new functionally relevant actions of $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ for final differentiation of inner hair cell (IHC) synapses, and (3) suggest $G\alpha_{13}$ to be important for central auditory adaptation processes.

G α_{12} and G α_{13} shape hair bundles

Using various *Gnai* mutant mouse lines we demonstrate that deficiency for $G\alpha_{13}$ but not $G\alpha_{12}$ produces high-frequency hearing loss, whereas the absence of both isoforms results in profound deafness resembling the phenotype seen in *Gpsm2* mouse mutants [19, 23].

Lower numbers and reduced elongation of stereocilia in high frequency cochlear turns in outer hair cells (OHCs) of *Gnai3* cKO mice and stereociliary elongation defects in IHC in basal turns [19] correlated with the deficiency for *Gnai3* in high frequency cochlear regions and high frequency hearing threshold loss. In contrast, due to an overlapping expression profile of $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ proteins we observed reduced numbers and impaired elongation of stereocilia together with low-frequency hearing threshold loss exclusively in the *Gnai2/i3* cKO mice which are deficient for both proteins. These findings uncover an unexpected difference of $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ functions for shaping size and length of hair cell stereociliary bundles specifically along the tonotopic axis and suggest selective $G\alpha_{13}$ functions for hearing

KARGER

function/structure	cochlear turn	Gnai2 gKO cKO	Gnai3 gKO	Gnai3 cKO	Gnai2/i3 cKO
A shape of stereocilia	normal	LF	✓	✓	✓
		HF	✓	✗	✗
	abnormal	LF	✓	✓	✓
		HF	✗	✗	✗
B IHC maturation	mature	LF	✓	✓	✓
		HF	✓	✓	✓
	immature	LF	✓	✓	✓
		HF	✗	✗	✗
C auditory brain stem response	normal	LF	✓	✓	✓
		HF	✓	✗	✗
	abnormal	LF	✓	✓	✓
		HF	✗	✗	✗
D neural gain		(n.d.)	no	yes	(n.d.)

Fig. 10. Schematic illustration of supposed roles of Gα₂ and Gα₃ for hearing. (A) Hair bundles in low-frequency cochlear regions are shaped by Gα₂ and Gα₃ activity and hair bundles in high-frequency cochlear regions are shaped by specific activity of Gα₃ that cannot be replaced by Gα₂. (B) During the maturation process the reorganization of the axosomatic efferent nerves is described by the downregulation of SK2 and upregulation of BK channels. Gα₂ and Gα₃ exhibit mutual redundant activity to trigger the final maturation of IHC synapses, whereas upon deletion of both Gα proteins IHCs remain in an immature stage characterized by a sustained SK2 expression and a failure of BK upregulation. (C) For hearing in low-frequency regions expression of either Gα₂ or Gα₃ is indispensable, whereas in high-frequency regions Gα₃ expression is crucial for proper hearing. (D) Central neural gain adjustment in response to impaired auditory input is presumably shaped by Gα₃ activity in satellite cells or brainstem auditory neurons, as Gα₃ is absent in *Gnai3* gKO but not in *Gnai3* cKO mice in these cells. n.d., not determined. LF, low-frequency. HF, high-frequency.

low and high pitch sounds. In this context the existence of frequency-specific complexes of either $G\alpha_{12}$ or $G\alpha_{13}$ together with actin regulatory proteins (such as espin, radixin, TRIOBP or twinfilin) [65-67] or with hair cell-specific myosins (Myosin 1c, 3a, 6, 7a and 15a) [65, 68] or proteins such as Eps8 (actin-binding protein epidermal growth factor receptor pathway substrate 8) [55, 69], whirlin [19] and proteins associated with the mechano-electrical transduction (MET) [70] may be considered.

The failure of proper activation of functionally intact MET may be explained through structural abnormalities of stereocilia in *Gnai3* KO mice, such as shorter hair bundles. Indeed, we have several implications that MET are functional: (i) normal slopes but reduced CAP amplitudes in *Gnai3* cKO mice point to functional MET currents [71] (ii) reduced summated potential (SP) amplitudes indicating functional MET currents although the activation of those seems to be hampered [47] (iii) the deficient growth of cochlear microphonics (CM) typically seen upon insufficient responses of MET currents to sound caused by an inappropriate activation of the MET channels [72] and (iv) the shallower slopes of the amplitude growth functions of early and late ABR waves at moderate sound intensities observed in global and conditional *Gnai3* KO mice point to reduced sensitivity to sound [73]. The overall findings thus suggest a failure of functionally intact MET activation in *Gnai3* KO mice following e.g. inappropriate coupling of shorter or disorganized stereocilia to the tectorial membrane. Reduced length of stereocilia despite normal biophysical properties of MET currents is also discussed for Eps8 mutants [55]. Eps8 shapes stereocilia length together with Usher protein candidates such as whirlin or myosin 15 along the entire tonotopic axis [74]. Deletion of the Eps8L2, a member of the Eps8-like protein family, causes deafness [55, 69] similarly to *Gnai2/i3* cKO. Strikingly, the deletion of Eps8 induced progressive high-frequency hearing loss [75] similar to the phenotype observed here in *Gnai3* KO mice. Further studies will clarify whether $G\alpha_i$ protein expression and/or signaling depends on Eps8 or *vice versa*. Moreover, it remained open in which signaling pathways $G\alpha_i$ integrates in the inner ear. Aside from classical GPCR-driven canonical pathways non-canonical mechanisms should be considered in future studies.

$G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ trigger maturation of IHC synapses

IHCs of *Gnai2/i3* cKO mice remain immature along the entire tonotopic axis as judged from a failure to upregulate BK and downregulate SK2 channels. Since *Gnai3* mutants develop a normal post-hearing IHC structural phenotype, the impairment of stereocilia elongation *per se* is unlikely the cause of the developmental block of IHC maturation. Deafness by itself does not prevent IHC maturation of *Gnai2/i3* cKO mice, as can be concluded from situations of hereditary deafness that do not prevent proper IHC maturation; for example the absence of thyroid hormone leads to deafness, but IHCs gradually develop after 2 months [76-78], whereas IHC maturation is still absent in 4- to 5-month-old *Gnai2/i3* cKO mice. The immature IHC phenotype of *Gnai2/i3* cKO mice may rather be considered in the context of a redundant $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ activity that acts together with myosin 6 e.g. on pruning of connected fibers. Accordingly a timely elimination of axosomatic efferent contacts [54-56], coincides with the initiation of biophysical maturation in IHCs [79] (see for a review [58]). Myosin 6 mutants show not only a defective structural integrity of the hair bundle but also an impaired post-hearing IHC maturation that includes the failure to properly target BK channels [80, 81], similar to *Gnai2/i3* cKO.

$G\alpha_{13}$ is essential for central auditory processing

An unexpected finding was a reduced compensatory neural gain in the *Gnai3* gKO but not in the *Gnai3* cKO mice that came along with a significantly accelerated worsening of hearing thresholds over age. For the auditory system, it was shown that the peripheral loss of response to sensory stimuli due to traumatic events, aging processes or genetic defects among others triggers central gain adjustment in order to re-stabilize the network through a disproportional elevation of the neuronal firing rate [31, 82, 83]. How target neurons of auditory nerve fibers, likely to be present in the dorsal [59] or ventral [84] cochlear nucleus

(DCN, VCN), sense nerve deprivation and re-stabilize their firing rate proportional to sensory decline is entirely elusive.

The finding that central compensation fails in *Gnai3* gKO but not in *Gnai3* cKO, despite comparable hearing threshold deficits, is surprising. It is tempting to speculate that G α_{13} expressing auditory neurons that may correspond to target cells of auditory nerves via their vGLUT1 positive contacts [85] may participate in generation of compensating central hyperactivity. Indeed, G α -G $\beta\gamma$ signaling has been shown to modulate basic G protein-activated K⁺-channel GIRK [86] in response to e.g. GABA_BR mediated (GABA “spillover”) activation from neighboring sites and thereby triggers elevated firing rates through shunting of excitatory currents [87]. Interestingly, following noise exposure elevated firing rates in the cochlear nucleus (CN) are accompanied by a modification of GABA_BR [88, 89]. In this context preliminary findings of lower vGLUT1 immunoreactivity in *Gnai3* gKO than *Gnai3* cKO mice may be indicative for less active transmitter release sites, as previously suggested [61]. Additionally, the absence of G α_{13} expression in satellite cells of the cochlea in global but not conditional *Gnai3* mutants (Fig. 8A) may lead to a differential excitability of cochlear neuronal cells as has been observed for the brain [90, 91]. Indeed, dysfunction of satellite cells has been shown to accelerate hearing loss over age and delays ABR wave I responses in high-frequency hearing loss [92] as seen here for *Gnai3* KO.

G α proteins and in particular the G α_{13} isoform have been previously linked to control asymmetric cell division and hair cell bundle polarity in the inner ear [16, 17, 19, 23]. Beyond that, our present findings indicate redundant functions of G α_{2} and G α_{13} for final maturation of synapses and low frequency hearing, whereas G α_{13} is indispensable for basal cochlea hair bundle shaping, high frequency hearing, and homeostatic excitability changes in the brain. As a consequence, G α cell functions are not only pathophysiologically important for hearing, but should also be considered in the context of novel functions for the sensory synapse and neuronal differentiation processes.

Conclusion

From invertebrates to mammals, G α proteins are involved in regulation of mitotic spindle dynamics, cell division, polarity, growth, and differentiation. We show for the sensory cells in the cochlea that the action of G α members is not limited to cilia movements or regulation of mitotic spindle dynamics in early development, but that distinct isoforms differentially account for early and later developmental steps. In particular G α proteins (*i*) shape stereociliary bundles isoform-specifically, (*ii*) act on differentiation of synapses during critical rewiring periods and (*iii*) allow for central adaptive neural gain responses.

Abbreviations

ABR (auditory brainstem response); AGS (activators of G-protein signaling); BK (Ca²⁺- and voltage-activated K⁺-channels of the BK type); CAP (compound action potential); CN (cochlear nucleus); CM (cochlear microphonic potential); cKO (conditional deletion); dB (decibel); DCN (dorsal cochlear nucleus); DPOAE (distortion product otoacoustic emissions); ES (embryonic stem cells); Eps8 (actin-binding protein epidermal growth factor receptor pathway substrate 8); f1 (DPOAE primary tone 1 frequency); f2 (DPOAE primary tone 2 frequency); GFP (green fluorescent protein); gKO (global deletion); G α (α subunit of G-proteins); GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor); GIRK (G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels); *Gnai* (gene coding for G α subunit); GPCR (G-protein-coupled receptors); *Gpsm2* (G protein signaling modulator 2); IHC (inner hair cells); I/O (input/output function); Kir4.1 (inward rectifying potassium channel); MET (mechanoelectrical transduction); Nf200 (neurofilament 200); n.s., not (significant); OHC (outer hair cell(s)); PTX (Pertussis Toxin); SD (standard deviation); SEM (standard error of the mean); SGN (spiral ganglion neuron); SK2 (small conductance Ca²⁺-activated K⁺-channel type 2); SP (summation potential); SPL (sound pressure level); VAMP 2 (vesicle-associated

KARGER

membrane protein 2); VCN (ventral cochlear nucleus); vGLUT 1 (vesicular glutamate transporter 1).

Acknowledgements

We thank Renate Riehle for excellent assistance, the personnel of the Bordeaux Imaging Center (BIC, a service unit of the CNRS-INSERM & Bordeaux Univ., supported by the French National Research Agency (ANR-10-INSB-04, "Investments for the Future"), and the LabEX BRAIN ANR-10-LABX-43. This study was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KN316/4-1, and KN316/12-1 to MK; FOR 729, project A2, SFB 612, project A8, and Nu53/13-1 to BN; FOR 729, project A6 to KP), from DAAD (Project ID 57390169) to BN, ICePhA grant (Z project: ICePhA mouse clinic) to BN, the Hahn Stiftung (Index AG), the INSERM and the ANR GHeArAct (ANR-14-CE13-0013-01) to MM, and the Intramural Research Program of the NIH (project Z01-ES-101643) to LB. B.N. conceived the project; S.B.-H., M.K., M.M., B.N., L.R. coordinated the study and designed research; S.B.-H., K.B., C.C., A.F., I.G., C.H., S.C.L., V.L., M.M., S.M., A.N., K.N., R.P.P., L.R. performed research; K.P., L.B., T.S. contributed reagents; S.B.-H., S.C.L., C.C., A.F., I.G., M.K., V.L., M.M., B.N., R.P.P., L.R. analyzed data; S.B.-H., I.G., M.K., V.L., M.M., B.N., L.R., T.S., W.S., U.Z. wrote the paper.

Disclosure Statement

The authors declare no competing financial interest.

References

- 1 Neves SR, Ram PT, Iyengar R: G protein pathways. *Science* 2002;296:1636-1639.
- 2 Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK: The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 2009;459:356-363.
- 3 Wong YH, Federman A, Pace AM, Zachary I, Evans T, Pouyssegur J, Bourne HR: Mutant G_{12} subunits inhibit cyclic AMP accumulation. *Nature* 1991;351:63-65.
- 4 Xiao RP, Avdonin P, Zhou YY, Cheng H, Akhter SA, Eschenhagen T, Lefkowitz RJ, Koch WJ, Lakatta EG: Coupling of β_2 -adrenoceptor to G α proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ Res* 1999;84:43-52.
- 5 Pines M, Santora A, Gierschik P, Menczel J, Spiegel A: The inhibitory guanine nucleotide regulatory protein modulates agonist-stimulated cAMP production in rat osteosarcoma cells. *Bone Miner* 1986;1:15-26.
- 6 Culurgioni S, Mapelli M: Going vertical: functional role and working principles of the protein Inscuteable in asymmetric cell divisions. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:4039-4046.
- 7 Blumer JB, Lanier SM: Activators of G protein signaling exhibit broad functionality and define a distinct core signaling triad. *Mol Pharmacol* 2014;85:388-396.
- 8 Malbon CC: G proteins in development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:689-701.
- 9 Morin X, Bellaïche Y: Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development. *Dev Cell* 2011;21:102-119.
- 10 Siller KH, Doe CQ: Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol* 2009;11:365-374.
- 11 Blumer JB, Oner SS, Lanier SM: Group II activators of G-protein signalling and proteins containing a G-protein regulatory motif. *Acta Physiol (Oxf)* 2012;204:202-218.
- 12 Williams SE, Ratliff LA, Postiglione MP, Knoblich JA, Fuchs E: Par3-mInsc and G_{α_3} cooperate to promote oriented epidermal cell divisions through LGN. *Nat Cell Biol* 2014;16:758-769.
- 13 Mochizuki N, Cho G, Wen B, Insel PA: Identification and cDNA cloning of a novel human mosaic protein, LGN, based on interaction with G α i2. *Gene* 1996;181:39-43.
- 14 Sato M, Blumer JB, Simon V, Lanier SM: Accessory proteins for G proteins: partners in signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006;46:151-187.

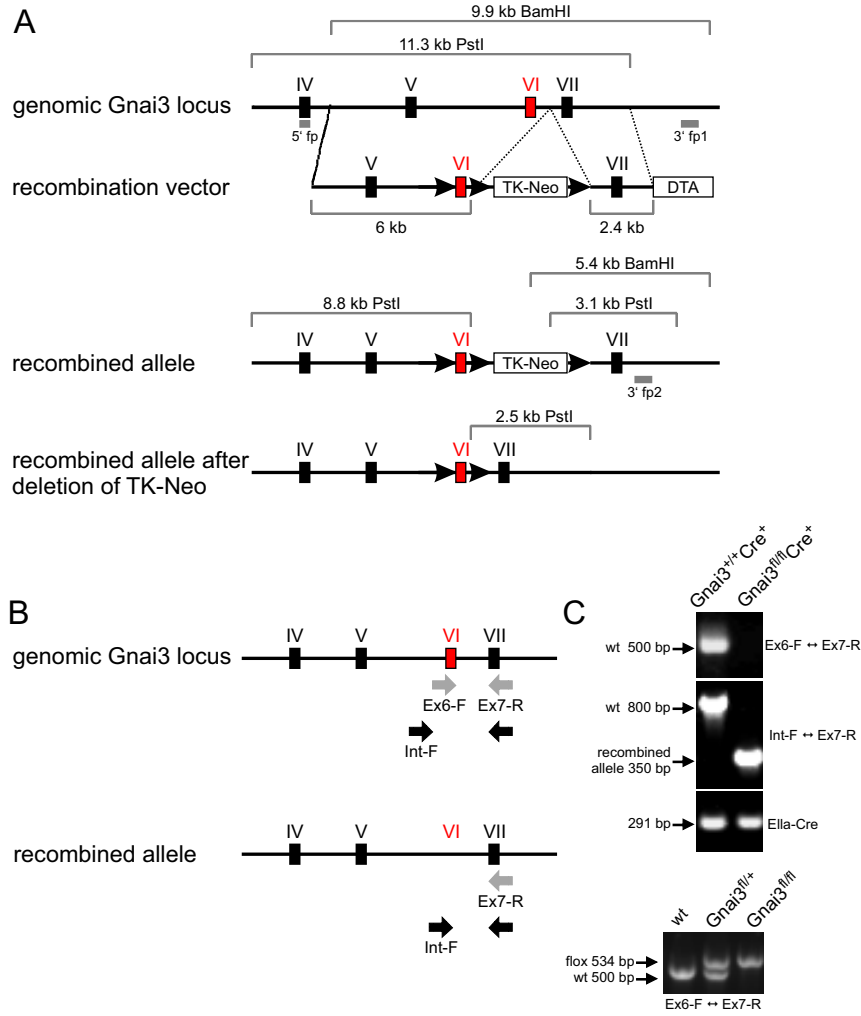
- 15 McCudden CR, Willard FS, Kimple RJ, Johnston CA, Hains MD, Jones MB, Siderovski DP: Ga selectivity and inhibitor function of the multiple GoLoco motif protein GPSM2/LGN. *Biochim Biophys Acta* 2005;1745:254-264.
- 16 Ezan J, Lasvaux L, Gezer A, Novakovic A, May-Simera H, Belotti E, Lhoumeau AC, Birnbaumer L, Beer-Hammer S, Borg JP, Le Bivic A, Nürnberg B, Sans N, Montcouquiol M: Primary cilium migration depends on G-protein signalling control of subapical cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 2013;15:1107-1115.
- 17 Tarchini B, Jolicœur C, Cayouette M: A molecular blueprint at the apical surface establishes planar asymmetry in cochlear hair cells. *Dev Cell* 2013;27:88-102.
- 18 Hamzeh AR, Nair F, Mohamed M, Saif F, Tawfiq N, Al-Ali MT, Bastaki F: A novel nonsense GPSM2 mutation in a Yemeni family underlying Chudley-McCullough syndrome. *Eur J Med Genet* 2016;59:337-341.
- 19 Mauriac SA, Hien YE, Bird JE, Carvalho SD, Peyrourou R, Lee SC, Moreau MM, Blanc JM, Geysler A, Medina C, Thoumine O, Beer-Hammer S, Friedman TB, Rüttiger L, Forge A, Nürnberg B, Sans N, Montcouquiol M: Defective Gpsm2/Galphi3 signalling disrupts stereocilia development and growth cone actin dynamics in Chudley-McCullough syndrome. *Nat Commun* 2017;8:14907.
- 20 Doherty D, Chudley AE, Coghlan G, Ishak GE, Innes AM, Lemire EG, Rogers RC, Mhanni AA, Phelps IG, Jones SJ, Zhan SH, Fejes AP, Shahin H, Kanaan M, Akay H, Tekin M, Consortium FC, Triggs-Raine B, Zelinski T: GPSM2 mutations cause the brain malformations and hearing loss in Chudley-McCullough syndrome. *Am J Hum Genet* 2012;90:1088-1093.
- 21 Walsh T, Shahin H, Elkan-Miller T, Lee MK, Thornton AM, Roeb W, Abu Rayyan A, Loulou S, Avraham KB, King MC, Kanaan M: Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GPSM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82. *Am J Hum Genet* 2010;87:90-94.
- 22 Yarif KO, Walsh T, Akay H, Duman D, Akkaynak AC, King MC, Tekin M: A truncating mutation in GPSM2 is associated with recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet* 2012;81:289-293.
- 23 Tarchini B, Tadenev AL, Devanney N, Cayouette M: A link between planar polarity and staircase-like bundle architecture in hair cells. *Development* 2016;143:3926-3932.
- 24 Jiang M, Spicher K, Boulay G, Martin-Requero A, Dye CA, Rudolph U, Birnbaumer L: Mouse gene knockout and knockin strategies in application to a subunits of Gi/Go family of G proteins. *Methods Enzymol* 2002;344:277-298.
- 25 Plummer NW, Spicher K, Malphurs J, Akiyama H, Abramowitz J, Nürnberg B, Birnbaumer L: Development of the mammalian axial skeleton requires signaling through the Gai subfamily of heterotrimeric G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:21366-21371.
- 26 Leiss V, Flockerzie K, Novakovic A, Rath M, Schonsiegel A, Birnbaumer L, Schurmann A, Harteneck C, Nürnberg B: Insulin secretion stimulated by L-arginine and its metabolite L-ornithine depends on Gα_{i2}. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;307:E800-812.
- 27 Hébert JM, McConnell SK: Targeting of cre to the Foxg1 (BF-1) locus mediates loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures. *Dev Biol* 2000;222:296-306.
- 28 Skokowa J, Ali SR, Felda O, Kumar V, Konrad S, Shushakova N, Schmidt RE, Piekorz RP, Nürnberg B, Spicher K, Birnbaumer L, Zwirner J, Claassens JW, Verbeek JS, van Rooijen N, Kohl J, Gessner JE: Macrophages induce the inflammatory response in the pulmonary Arthus reaction through Gα_{i2} activation that controls C5aR and Fc receptor cooperation. *J Immunol* 2005;174:3041-3050.
- 29 Gohla A, Klement K, Piekorz RP, Pexa K, vom Dahl S, Spicher K, Dreval V, Haussinger D, Birnbaumer L, Nürnberg B: An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein G_{β3} in the autophagic action of insulin in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:3003-3008.
- 30 Rudolph U, Finegold MJ, Rich SS, Harriman GR, Srinivasan Y, Brabet P, Boulay G, Bradley A, Birnbaumer L: Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G alpha i2-deficient mice. *Nature Genetics* 1995;10:143-150.
- 31 Zuccotti A, Kuhn S, Johnson SL, Franz C, Singer W, Hecker D, Geisler HS, Köpschall I, Rohbock K, Gutsche K, Dlugaczkyk J, Schick B, Marcotti W, Rüttiger L, Schimmang T, Knipper M: Lack of brain-derived neurotrophic factor hampers inner hair cell synapse physiology, but protects against noise-induced hearing loss. *J Neurosci* 2012;32:8545-8553.
- 32 Chumak T, Rüttiger L, Lee SC, Campanelli D, Zuccotti A, Singer W, Popelar J, Gutsche K, Geisler HS, Schraven SP, Jaumann M, Panford-Walsh R, Hu J, Schimmang T, Zimmermann U, Syka J, Knipper M: BDNF in lower

- brain parts modifies auditory fiber activity to gain fidelity but increases the risk for generation of central noise after injury. *Mol Neurobiol* 2015;53:5607-5627.
- 33 Engel J, Braig C, Rüttiger L, Kuhn S, Zimmermann U, Blin N, Sausbier M, Kalbacher H, Münkner S, Rohbock K, Ruth P, Winter H, Knipper M: Two classes of outer hair cells along the tonotopic axis of the cochlea. *Neuroscience* 2006;143:837-849.
- 34 Winter H, Rüttiger L, Müller M, Kuhn S, Brandt N, Zimmermann U, Hirt B, Bress A, Sausbier M, Conscience A, Flamant F, Tian Y, Zuo J, Pfister M, Ruth P, Löwenheim H, Samarut J, Engel J, Knipper M: Deafness in TRB mutants is caused by malformation of the tectorial membrane. *J Neurosci* 2009;29:2581-2587.
- 35 Davies S, Forge A: Preparation of the mammalian organ of Corti for scanning electron microscopy. *J Microscopy* 1987;147:89-101.
- 36 Knipper M, Gestwa L, Ten Cate WJ, Lautermann J, Brugger H, Maier H, Zimmermann U, Rohbock K, Köpschall I, Wiechers B, Zenner HP: Distinct thyroid hormone-dependent expression of TrkB and p75^{N^{GFR}} in nonneuronal cells during the critical TH-dependent period of the cochlea. *J Neurobiol* 1999;38:338-356.
- 37 Singer W, Zuccotti A, Jaumann M, Lee SC, Panford-Walsh R, Xiong H, Zimmermann U, Franz C, Geisler HS, Köpschall I, Rohbock K, Varakina K, Verpoorten S, Reinbothe T, Schimmang T, Rüttiger L, Knipper M: Noise-induced inner hair cell ribbon loss disturbs central arc mobilization: a novel molecular paradigm for understanding tinnitus. *Mol Neurobiol* 2013;47:261-279.
- 38 Hahn H, Müller M, Löwenheim H: Whole organ culture of the postnatal sensory inner ear in simulated microgravity. *J Neurosci Methods* 2008;171:60-71.
- 39 Tan J, Rüttiger L, Panford-Walsh R, Singer W, Schulze H, Kilian SB, Hadjab S, Zimmermann U, Köpschall I, Rohbock K, Knipper M: Tinnitus behavior and hearing function correlate with the reciprocal expression patterns of BDNF and Arg3.1/arc in auditory neurons following acoustic trauma. *Neuroscience* 2007;145:715-726.
- 40 Winter H, Braig C, Zimmermann U, Engel J, Rohbock K, Knipper M: Thyroid hormone receptor alpha1 is a critical regulator for the expression of ion channels during final differentiation of outer hair cells. *Histochem Cell Biol* 2007;128:65-75.
- 41 Winter H, Braig C, Zimmermann U, Geisler HS, Franzer JT, Weber T, Ley M, Engel J, Knirsch M, Bauer K, Christ S, Walsh EJ, McGee J, Köpschall I, Rohbock K, Knipper M: Thyroid hormone receptors TRa1 and TRB differentially regulate gene expression of Kcnq4 and prestin during final differentiation of outer hair cells. *J Cell Sci* 2006;119:2975-2984.
- 42 Ezan J, Montcouquiol M: Revisiting planar cell polarity in the inner ear. *Semin Cell Develop Biol* 2013;24:499-506.
- 43 Zampini V, Johnson SL, Franz C, Lawrence ND, Münkner S, Engel J, Knipper M, Magistretti J, Masetto S, Marcotti W: Elementary properties of Ca_v1.3 Ca²⁺ channels expressed in mouse cochlear inner hair cells. *J Physiol* 2010;588:187-199.
- 44 Dallos P, Harris D: Properties of auditory nerve responses in absence of outer hair cells. *J Neurophysiol* 1978;41:365-383.
- 45 Verpy E, Weil D, Leibovici M, Goodyear RJ, Hamard G, Houdon C, Lefevre GM, Hardelin JP, Richardson GP, Avan P, Petit C: Stereocilin-deficient mice reveal the origin of cochlear waveform distortions. *Nature* 2008;456:255-258.
- 46 Bourien J, Tang Y, Batrel C, Huet A, Lenoir M, Ladrech S, Desmadryl G, Nouvian R, Puel JL, Wang J: Contribution of auditory nerve fibers to compound action potential of the auditory nerve. *J Neurophysiol* 2014;112:1025-1039.
- 47 Durrant JD, Wang J, Ding DL, Salvi RJ: Are inner or outer hair cells the source of summing potentials recorded from the round window? *J Acoust Soc Am* 1998;104:370-377.
- 48 Patuzzi RB, Yates GK, Johnstone BM: Outer hair cell receptor current and sensorineural hearing loss. *Hear Res* 1989;42:47-72.
- 49 Belyantseva IA, Adler HJ, Curi R, Frolenkov GI, Kachar B: Expression and localization of prestin and the sugar transporter GLUT-5 during development of electromotility in cochlear outer hair cells. *J Neurosci* 2000;20:RC116.
- 50 Weber T, Zimmermann U, Winter H, Mack A, Köpschall I, Rohbock K, Zenner HP, Knipper M: Thyroid hormone is a critical determinant for the regulation of the cochlear motor protein prestin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2901-2906.

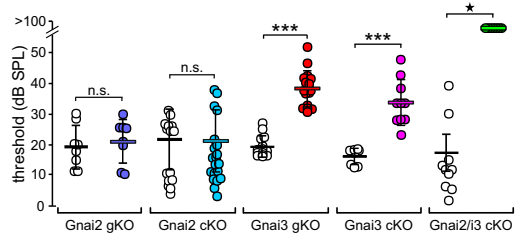
- 51 Kharkovets T, Hardelin JP, Safieddine S, Schweizer M, El-Amraoui A, Petit C, Jentsch TJ: KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4333-4338.
- 52 Beisel KW, Rocha-Sanchez SM, Morris KA, Nie L, Feng F, Kachar B, Yamoah EN, Fritzsche B: Differential expression of KCNQ4 in inner hair cells and sensory neurons is the basis of progressive high-frequency hearing loss. *J Neurosci* 2005;25:9285-9293.
- 53 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: Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell* 2006;127:277-289.
- 54 Roux I, Wersinger E, McIntosh JM, Fuchs PA, Glowatzki E: Onset of cholinergic efferent synaptic function in sensory hair cells of the rat cochlea. *J Neurosci* 2011;31:15092-15101.
- 55 Zampini V, Rüttiger L, Johnson SL, Franz C, Furness DN, Waldhaus J, Xiong H, Hackney CM, Holley MC, Offenhauser N, Di Fiore PP, Knipper M, Masetto S, Marcotti W: Eps8 regulates hair bundle length and functional maturation of mammalian auditory hair cells. *PLoS Biol* 2011;9:e1001048, doi:10.1371/journal.pbio.1001048.
- 56 Katz E, Elgoyhen AB, Gomez-Casati ME, Knipper M, Vetter DE, Fuchs PA, Glowatzki E: Developmental regulation of nicotinic synapses on cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 2004;24:7814-7820.
- 57 Marcotti W: Functional assembly of mammalian cochlear hair cells. *Exp Physiol* 2012;97:438-451.
- 58 Knipper M, Panford-Walsh R, Singer W, Rüttiger L, Zimmermann U: Specific synaptopathies diversify brain responses and hearing disorders: you lose the gain from early life. *Cell Tissue Res* 2015;361:77-93.
- 59 Kaltenbach JA, Zhang J: Intense sound-induced plasticity in the dorsal cochlear nucleus of rats: evidence for cholinergic receptor upregulation. *Hearing Res* 2007;226:232-243.
- 60 Keine C, Rubsamen R, Englitz B: Inhibition in the auditory brainstem enhances signal representation and regulates gain in complex acoustic environments. *eLife* 2016;5, doi:10.7554/eLife.19295.
- 61 Ngodup T, Goetz JA, McGuire BC, Sun W, Lauer AM, Xu-Friedman MA: Activity-dependent, homeostatic regulation of neurotransmitter release from auditory nerve fibers. *Proc Nat Acad Sci USA* 2015;112:6479-6484.
- 62 Zou J, Zhang Y, Yin S, Wu H, Pyykkö I: Mitochondrial dysfunction disrupts trafficking of Kir4.1 in spiral ganglion satellite cells. *J Neurosci Res* 2009;87:141-149.
- 63 Hibino H, Horio Y, Fujita A, Inanobe A, Doi K, Gotow T, Uchiyama Y, Kubo T, Kurachi Y: Expression of an inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, in satellite cells of rat cochlear ganglia. *Am J Physiol* 1999;277:C638-644.
- 64 Sonntag M, Blosa M, Schmidt S, Rubsamen R, Morawski M: Perineuronal nets in the auditory system. *Hearing Res* 2015;329:21-32.
- 65 Manor U, Kachar B: Dynamic length regulation of sensory stereocilia. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:502-510.
- 66 Vogl C, Butola T, Haag N, Hausrat TJ, Leitner MG, Moutschen M, Lefebvre PP, Speckmann C, Garrett L, Becker L, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Nietzsche S, Kessels MM, Oliver D, Kneussel M, Kilimann MW, Strenzke N: The BEACH protein LRBA is required for hair bundle maintenance in cochlear hair cells and for hearing. *EMBO reports* 2017.
- 67 Drummond MC, Barzik M, Bird JE, Zhang DS, Lechene CP, Corey DP, Cunningham LL, Friedman TB: Live-cell imaging of actin dynamics reveals mechanisms of stereocilia length regulation in the inner ear. *Nat Commun* 2015;6:6873.
- 68 Marcotti W, Corns LF, Goodyear RJ, Rzadzinska AK, Avraham KB, Steel KP, Richardson GP, Kros CJ: The acquisition of mechano-electrical transducer current adaptation in auditory hair cells requires myosin VI. *J Physiol* 2016;594:3667-3681.
- 69 Behloul A, Bonnet C, Abdi S, Bouaita A, Lelli A, Hardelin JP, Schietroma C, Rous Y, Louha M, Cheknane A, Lebdi H, Boudjelida K, Makrelouf M, Zenati A, Petit C: EPS8, encoding an actin-binding protein of cochlear hair cell stereocilia, is a new causal gene for autosomal recessive profound deafness. *Orphanet J Rare Dis* 2014;9:55, doi:10.1186/1750-1172-9-55.
- 70 Alagramam KN, Goodyear RJ, Geng R, Furness DN, van Aken AF, Marcotti W, Kros CJ, Richardson GP: Mutations in protocadherin 15 and cadherin 23 affect tip links and mechanotransduction in mammalian sensory hair cells. *PLoS one* 2011;6:e19183, doi:10.1371/journal.pone.0019183.

- 71 Barral J, Martin P: The physical basis of active mechanosensitivity by the hair-cell bundle. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2011;19:369-375, doi:10.1097/MOO.0b013e32834a8c33.
- 72 Patuzzi R: Non-linear aspects of outer hair cell transduction and the temporary threshold shifts after acoustic trauma. *Audiol Neurootol* 2002;7:17-20.
- 73 Elberling C, Don M: Threshold characteristics of the human auditory brain stem response. *J Acoust Soc Am* 1987;81:115-121.
- 74 Ebrahim S, Ingham NJ, Lewis MA, Rogers MJ, Cui R, Kachar B, Pass JC, Steel KP: Alternative splice forms influence functions of whirlin in mechanosensory hair cell stereocilia. *Cell Rep* 2016;15:935-943.
- 75 Furness DN, Johnson SL, Manor U, Rüttiger L, Tocchetti A, Offenhauser N, Olt J, Goodyear RJ, Vijayakumar S, Dai Y, Hackney CM, Franz C, Di Fiore PP, Masetto S, Jones SM, Knipper M, Holley MC, Richardson GP, Kachar B, Marcotti W: Progressive hearing loss and gradual deterioration of sensory hair bundles in the ears of mice lacking the actin-binding protein Eps8L2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:13898-13903.
- 76 Brandt N, Kuhn S, Münkner S, Braig C, Winter H, Blin N, Vonthein R, Knipper M, Engel J: Thyroid hormone deficiency affects postnatal spiking activity and expression of Ca²⁺ and K⁺ channels in rodent inner hair cells. *J Neurosci* 2007;27:3174-3186.
- 77 Sendin G, Bulankina AV, Riedel D, Moser T: Maturation of ribbon synapses in hair cells is driven by thyroid hormone. *J Neurosci* 2007;27:3163-3173.
- 78 Rüschi A, Ng L, Goodyear R, Oliver D, Lisoukov I, Vennstrom B, Richardson G, Kelley MW, Forrest D: Retardation of cochlear maturation and impaired hair cell function caused by deletion of all known thyroid hormone receptors. *J Neurosci* 2001;21:9792-9800.
- 79 Marcotti W, Johnson SL, Rüschi A, Kros CJ: Sodium and calcium currents shape action potentials in immature mouse inner hair cells. *J Physiol* 2003;552:743-761.
- 80 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: Otoferlin interacts with myosin VI: implications for maintenance of the basolateral synaptic structure of the inner hair cell. *Hum Mol Genet* 2009;18:2779-2790.
- 81 Roux I, Hosie S, Johnson SL, Bahloul A, Cayet N, Nouaille S, Kros CJ, Petit C, Safieddine S: Myosin VI is required for the proper maturation and function of inner hair cell ribbon synapses. *Hum Mol Genet* 2009;18:4615-4628.
- 82 Schaette R, McAlpine D: Tinnitus with a normal audiogram: physiological evidence for hidden hearing loss and computational model. *J Neurosci* 2011;31:13452-13457.
- 83 Heeringa AN, van Dijk P: The dissimilar time course of temporary threshold shifts and reduction of inhibition in the inferior colliculus following intense sound exposure. *Hear Res* 2014;312:38-47.
- 84 Mulders WH, Robertson D: Progressive centralization of midbrain hyperactivity after acoustic trauma. *Neuroscience* 2011;192:753-760.
- 85 Heeringa AN, Stefanescu RA, Raphael Y, Shore SE: Altered vesicular glutamate transporter distributions in the mouse cochlear nucleus following cochlear insult. *Neuroscience* 2016;315:114-124.
- 86 Claydon TW, Makary SY, Dibb KM, Boyett MR: The selectivity filter may act as the agonist-activated gate in the G protein-activated Kir3.1/Kir3.4 K⁺ channel. *J Biol Chem* 2003;278:50654-50663.
- 87 Otmakhova NA, Lisman JE: Contribution of Ih and GABAB to synaptically induced afterhyperpolarizations in CA1: a brake on the NMDA response. *J Neurophysiol* 2004;92:2027-2039.
- 88 Kou ZZ, Qu J, Zhang DL, Li H, Li YQ: Noise-induced hearing loss is correlated with alterations in the expression of GABAB receptors and PKC gamma in the murine cochlear nucleus complex. *Frontiers Neuroanat* 2013;7:25, doi:10.3389/fnana.2013.00025.
- 89 Lujan R, Shigemoto R, Kulik A, Juiz JM: Localization of the GABAB receptor 1a/b subunit relative to glutamatergic synapses in the dorsal cochlear nucleus of the rat. *J Comp Neurol* 2004;475:36-46.
- 90 Robel S, Sontheimer H: Glia as drivers of abnormal neuronal activity. *Nature Neurosci* 2016;19:28-33.
- 91 Igelhorst BA, Niederkinkhaus V, Karus C, Lange MD, Dietzel ID: Regulation of neuronal excitability by release of proteins from glial cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015;370, doi:10.1098/rstb.2014.0194.
- 92 Akil O, Sun Y, Vijayakumar S, Zhang W, Ku T, Lee CK, Jones S, Grabowski GA, Lustig LR: Spiral ganglion degeneration and hearing loss as a consequence of satellite cell death in saposin B-deficient mice. *J Neurosci* 2015;35:3263-3275, doi:10.1523/JNEUROSCI.3920-13.2015.

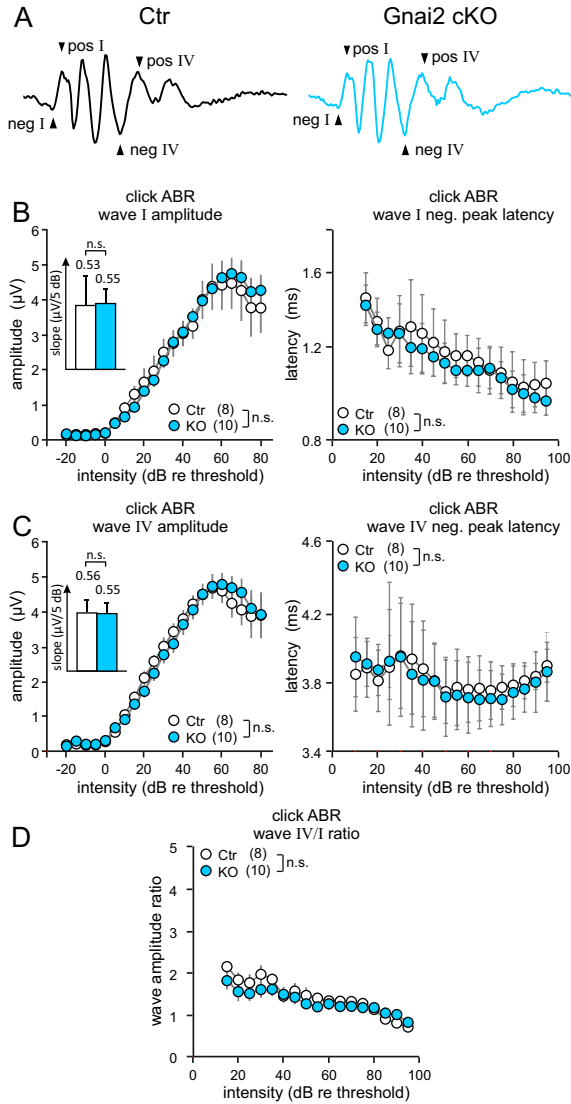
Suppl_Figure 1



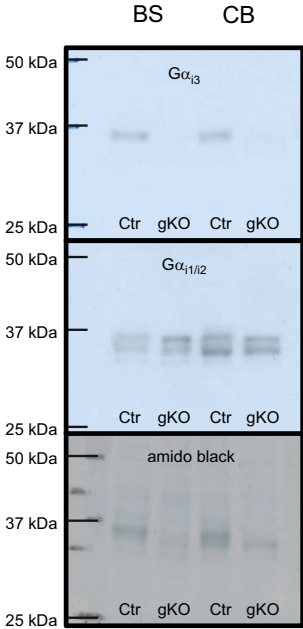
Suppl_Figure 2



Suppl_Figure 3



Suppl_Figure 4



SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Supplemental Figure 1. Conditional inactivation of the $G\alpha_{i3}$ gene.

(A) The organization of part of the murine *Gnai3* genomic locus (top), the linearized targeting vector (upper middle), and the targeted *Gnai3* allele before (lower middle) and after (bottom) deletion of the *TK-Neo* resistance cassette are shown. The *TK-Neo* resistance cassette was inserted into intron 6 of the *Gnai3* gene. Exon sequences are represented by filled rectangles, intron sequences by a black line. Restriction sites are PstI and BamHI and the relevant restriction fragments for detection of the WT or targeted alleles are shown. The location of the probe fragments for Southern blot hybridization is indicated as 5' fp, 3' fp1 and 3' fp2.

(B) PCR strategy. The deletion of the floxed exon 6 of *Gnai3* was induced by breeding of conditional *Gnai3^{fl/fl}* mice (C57BL/6-Sv129) on an EIIa-Cre-positive background. The EIIa-Cre mouse line expresses the Cre recombinase under the control of the adenovirus EIIa promoter in the early mouse embryo resulting in a general deletion of the floxed sequence.

(C) Genotyping PCR was performed from tail biopsies of the indicated mouse strains (Ex6-F \leftrightarrow Ex7-R: *Gnai3^{fl/fl}*=534 bp, *Gnai3^{+/+}*=500 bp; Int-F \leftrightarrow Ex7-R: *Gnai3^{fl/fl}*=350bp, *Gnai3^{+/+}*=800 bp; EIIa-Cre=291 bp).

Supplemental Figure 2. Click-ABR thresholds of gene-targeted *Gnai* KO mice.

Click-evoked ABR (click-ABR) thresholds for the mice mutants (global deletion of *Gnai2*, dark blue, conditional deletion of *Gnai2*, light blue, global deletion of *Gnai3*, red, conditional deletion of *Gnai3*, purple, conditional double deletion of *Gnai2/i3*, green) vs. their respective controls (white). Horizontal and vertical bars represent mean and SD, respectively. Circles indicate single ear thresholds. n.s. not significant, *** $p < 0.001$ 2-sample student's t-test, ★ $p < 0.05$ Fisher's exact test.

Supplemental Figure 3. ABR amplitudes, latencies, and click-ABR wave IV to wave I amplitude ratios (wave IV/I ratio) in conditional *Gnai2* KO mice.

(A) ABR waveform with the indication of wave I and IV peak-to-peak amplitude and the leading peak latency from one individual ear of a control mouse (black line) and a KO mouse (colored line) evoked at the level of 40 dB above the hearing threshold are shown.

(B) Mean±SEM click-ABR wave I amplitude (left panel), mean±SD wave I leading peak latency I/O function (right panel), and mean±SD of wave I amplitude slope (inset of left panel) for *Gnai2* cKO mice, and their respective controls. Amplitudes, amplitude slopes, and latencies are similar in KO mice and controls. Mean values of the amplitude slopes are shown above the corresponding bars in the insets.

(C) Mean±SEM click-ABR wave IV amplitude (left panel), mean ± SD wave I leading peak latency I/O function (right panel), and mean±SD of wave IV amplitude slopes (inset of left panel) for *Gnai2* cKO mice and their respective controls. Amplitudes, amplitude slopes, and latencies are similar between KO mice and controls. Mean values of the amplitude slopes are shown above the corresponding bars in the inset of the left panel.

(D) Mean±SEM click-ABR wave IV/I ratios at increasing stimulus level for the *Gnai2* cKO and their respective controls. Data points represent the mean of 8 to 10 ears (numbers in brackets close to legend key) from 4 to 5 mice.

Supplemental Figure 4. Expression of $G\alpha_{i3}$ in the CNS.

Representative immunoblots of brain stem (BS) and cerebellum (CB) homogenates isolated from control and *Gnai3* gKO mice. $G\alpha_{i3}$ protein is completely absent in *Gnai3* gKO BS and CB tissue (upper panel), whereas $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_{i2}$ proteins were detectable in control and *Gnai3* gKO mice (lower panel). 10 μ g protein per lane were loaded. The membrane was first stained with the $G\alpha_{i3}$ antibody, stripped and subsequently stained with the $G\alpha_{i1/2}$ antibody. To control equal loading, the membrane was stained with Amido black. As Amido black is stained after the incubation with the specific antibodies, the $G\alpha_i$ -bands detected with the antibodies are very strong, but looking at the total lane, an equal loading is visible. Brain stem and cerebellar tissues from 3 animals per genotype were analyzed in 3 independent experiments. For size orientation protein standards were loaded (BioRad Precision Plus Protein Standard Dual Colour, and Nippon Genetics BlueStar PLUS Prestained Protein Standard).

Supplemental TABLE LEGENDS

Supplemental Table 1 Resource data for Materials.

Supplemental Table 2 Statistical information and n numbers.

Supplemental Table 3 Stereocilia length and number in basal cochlear turns of outer hair cells of

Ctr and *Gnai3* cKO mice. (*): significant to Ctr

Supplemental Table 1

Reagent	Source	Identifier
Antibodies		
BK, 1:200	rb, Alomone Labs, Jerusalem, Israel	#APC-021
CtBP2/RIBEYE, 1:1,500	rb, American Research Products, Waltham, MA, USA	#10-P1554
KCNQ4, 1:50	rb, generated by Knipper lab [41]	[40]
NF200, 1:8,000	ms, sigma	#N0142
SK2, 1:50	rb, sigma	#P0483
otoferlin, 1:100	ms, LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA	#LS-C 153337
prestin, 1:250	gt, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	#SC-22692
VAMP 2 or Synaptobrevin-2, 1:200	ms, Synaptic Systems, Göttingen, Germany	#104211
vGLUT 1, 1:1,500	gp, Synaptic Systems, Göttingen, Germany	#135304
espin, 1:100	ms, Fisher Scientific, Schwerte, Germany; BD Biosciences	#BDB611656
Gα _{11/12} -specific antibodies, 1:200	Charles River, Squarix customer made for Nürnberg lab	[25, 26, 29]
Gα ₁₃ -specific antibodies, 1:100	7Biosciences, customer made for Nürnberg lab [19, this study]	[19]
Alexa Fluor 568 Phalloidin, 1:400	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	#12380
Kir4.1, 1:100	ms, Sigma	#WH0003766M1
brevican, 1:100	ms, BD-Biosciences	#610895
GFP, 1:400	rb, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA	#NB-600308
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Dulbecco's modified Eagle's medium	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	41966-029
Glutamine	Seromed, Wien, Austria	K 0283
Penicillin/streptomycin	Seromed, Wien, Austria	A 2213
Leukemia inhibitory factor	own production	N/A
2-Mercaptoethanol	Invitrogen	31350-010
Fetal bovine serum	Pan Biotech, Aidenbach, Germany	P30-3300
G418	Seromed, Wien, Austria	A 2712
Ganciclovir (Cymeven)	Syntex	115561
BamHI	Roche	#10 220 612 001
PstI	Roche	#10 621 625 001
paraformaldehyde	Merck	#1.04005.1000
sucrose	Merck	#1.07651.1000
phosphate buffered saline	GIBCO	#Cat.No.18912-014
Tris	Roth	5429.2
SDS	Roth	2326.2
2-Mercaptoethanol	Merck	4201937
PMSF	Calbiochem	52332
Urea	Sigma	51456

Supplemental Table 1

Critical Commercial Assays		
RDO rapid decalcifier	Apex Engineering Products Corporation, Aurora, IL, USA; German costumer, MEDITE	#41-5711-00
Experimental Models: Organisms/Strains		
C57BL/6 blastocysts isolated from C57BL/6N mice	Charles River	N/A
Ella-Cre mice (B6.FVB-Tg(Ella-cre)C5379Lmgd/J)	Jax mice	003724
FoxG1-Cre mice (B6.129P2(Cg)-Foxg1tm1(Cre)Skml/J)	Jax mice	006084
<i>Gnai2</i> -ko mice	Lutz Birnbaumer, NIH [30]	N/A
<i>Gnai3</i> -ko mice	Lutz Birnbaumer, NIH, [24, 29]	N/A
<i>Gnai2</i> -floxed mice	Lutz Birnbaumer, NIH, [25, 26]	N/A
<i>Gnai3</i> -floxed mice	Nürnberg lab [this study]	N/A
<i>Gnai3</i> -GFP mice	Cyagen Biosciences, USA for Nürnberg lab [this study]	N/A
Oligonucleotides		
5'-GCAATTATCTTTTGTGGC-3' (Ex6-F)	Biomers, Ulm, Germany	N/A
5'-ATGCTGCAAACAATTCATGC-3' (Ex7-R)	Biomers, Ulm, Germany	N/A
5'-TAGCAGTTGTCATGGCTACC-3' (Int-F)	Biomers, Ulm, Germany	N/A
5'-GGCTATGATCCCCAAACTCCCCG-3' (for)	Biomers, Ulm, Germany	N/A
5'-GTGGTAAGCCTGTGTTGTGAGAG-3' (rev)	Biomers, Ulm, Germany	N/A
Recombinant DNA		
eGFP-cDNA	Clontech, Takara, USA	N/A
pBluescript	Agilent technologies, Santa Clara, USA	N/A
Other		
cellSens Dimension software	OSIS GmbH, Münster, Germany	[43]
LabWindows CVI	National Instruments, Austin TX, USA	Ver. 8

Supplemental Table 2

Figure	parameter	number of mice	p value	statistics
Fig. 1A	f-ABR Gnai2 gKO	4 mice 1♂, 3♀/ genotype	p = 0.223 F(1, 58) = 1.52	2-way ANOVA followed by post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test
Fig. 1B	f-ABR Gnai2 cKO	Ctr: 6 mice, 2♂, 4♀ KO: 7 mice, 3♂, 4♀	p = 0.933 F(1, 70) = 0.007	2-way ANOVA followed by post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test
Fig. 1C	f-ABR Gnai3 gKO	Ctr: 7 mice, 5♂, 2♀ KO: 8 mice, 6♂, 2♀	p < 0.0001 F(1, 110) = 146	2-way ANOVA followed by post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test
Fig. 1D	f-ABR Gnai3 cKO	Ctr: 8 mice, 6♂, 2♀ KO: 8 mice, 5♂, 3♀	p < 0.0001 F(1, 127) = 132	2-way ANOVA followed by post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test
Fig. 1E	f-ABR Gnai2/i3 cKO	Ctr: 5 mice, 3♂, 2♀ KO: 4 mice, 2♂, 2♀	p < 0.0001	Fisher's exact test
Fig. 1F	click-ABR Gnai2 gKO	4 mice: 1♂, 3♀/genotype	p = 0.619, t = 0.51, df = 14	2-tailed unpaired Student's t-test
	click-ABR Gnai2 cKO	Ctr: 2♂ mice/KO: 3♂ mice	p = 0.973, t = 0.03, df = 8	
	click-ABR Gnai3 gKO	Ctr: 7 mice, 5♂, 2♀ KO: 8 mice, 6♂, 2♀	p < 0.0001, t = 10.5, df = 28	
	click-ABR Gnai3 cKO	Ctr: 8 mice, 6♂, 2♀ KO: 8 mice, 5♂, 3♀	p < 0.0001, t = 5.09, df = 30	
	click-ABR Gnai2/i3 cKO	Ctr: 5 mice, 3♂, 2♀ KO: 4 mice, 2♂, 2♀	p < 0.001	
Fig. 2A	DPOAE Gnai2 gKO	4 mice: 1♂, 3♀/genotype	Thr: p = 0.59, F(1, 98) = 0.3 I/O: p = 0.92, F(1, 196) = 0.60	2-way ANOVA followed by post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test
Fig. 2B	DPOAE Gnai2 cKO	Ctr: 4 mice, 2♂, 2♀ KO: 5 mice, 3♂, 2♀	Thr: p = 0.61, F(1, 84) = 0.26 I/O: p = 0.289, F(1, 210) = 1.13	2-way ANOVA followed by post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test
Fig. 2C	DPOAE Gnai3 gKO	Ctr: 5 mice, 4♂, 1♀ KO: 5 mice, 3♂, 2♀	Thr: p < 0.0001, F(1, 118) = 23.6 I/O: p < 0.0001, F(1, 318) = 121	2-way ANOVA followed by post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test
Fig. 2D	DPOAE Gnai3 cKO	Ctr: 7 mice, 5♂, 2♀ KO: 7 mice, 4♂, 3♀	Thr: p < 0.0001, F(1, 182) = 103 I/O: p < 0.0001, F(1, 348) = 120.6	2-way ANOVA followed by post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test
Fig. 2E	DPOAE Gnai2/Gnai3 cKO	Ctr: 2 mice, 1♂, 1♀ KO: 2 ♀ mice	Thr: p < 0.0001, F(1, 35) = 80.3	2-way ANOVA followed by post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test
		Ctr: 5 mice, 3♂, 2♀ KO: 4 mice, 2♂, 2♀	I/O: p < 0.0001, F(1, 169) = 356	

Supplemental Table 2

Fig. 3B	Shape of OHC stereocilia (angle) Gnai3 gKO (32-36 cells) Gnai3 Control (26-29 cells)	n=4-8 n=8 n=4	p < 0.001	Fisher's exact test
Fig. 3E	Stereocilia length and number	4 - 5 mice/ genotype	length: p = 0.0107; U = 49 number: p = 0.0001; U = 58.5	Non-parametric, two-tailed Mann-Whitney Test
Fig. 5A	Gnai3 cKO, CAP	Ctr: 4 mice, 3♂, 1♀ KO: 4 mice, 3♂, 1♀	p < 0.0001, F(1, 126) = 79.1	2-way ANOVA followed by post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test
Fig. 5B	Gnai3 cKO, SP		p = 0.006, F(1, 136) = 14	
Fig. 5C	Gnai3 cKO, CM		p < 0.0001, F(1, 84) = 24.2	
Fig. 6D	Gnai3 cKO IHC ribbon numbers	Ctr: 3 mice, 1♂, 2♀ KO: 3 mice, 1♂, 2♀	p = 0.75, F(1, 12) = 0.11	2-way ANOVA followed by post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test
Fig. 7B	Gnai3 gKO (click ABR)			
	wave I amplitude wave I neg. peak latency wave IV amplitude wave IV neg. peak latency	Ctr: 7 mice, 5♂, 2♀ KO: 9 mice, 7♂, 2♀	p < 0.001, F(1, 432) = 68.8 p < 0.001, F(1, 402) = 920 p < 0.001, F(1, 421) = 172 p = 0.1, F(1, 397) = 2.78	2-way ANOVA followed by post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test
	slope of wave I amplitude growth slope of wave IV amplitude growth		p = 0.006, t = 2.99, df = 29 p = 0.0001, t = 4.43, df = 29	2-tailed unpaired Student's t-test
Fig. 7C	Gnai3 cKO (click ABR)			
	wave I amplitude wave I neg. peak latency wave IV amplitude wave IV neg. peak latency	Ctr: 9 mice, 6♂, 3♀ KO: 7 mice, 3♂, 4♀	p < 0.001, F(1, 412) = 340 p < 0.001, F(1, 393) = 443 p < 0.001, F(1, 453) = 64.4 p = 0.21, F(1, 424) 1.61	2-way ANOVA followed by post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test
	slope of wave I amplitude growth slope of wave IV amplitude growth		p = 0.002, t = 3.44, df = 25 p = 0.0005, t = 3.93, df = 27	2-tailed unpaired Student's t-test
Fig. 7D	f-ABR Gnai3 gKO vs. gCtr	Ctr: 5 mice, 4♂, 1♀ KO: 5 mice, 3♂, 4♀	p < 0.0001, t = 7.14, df = 9	2-tailed unpaired Student's t-test
	f-ABR Gnai3 cKO vs. cCtr	Ctr: 5 mice, 3♂, 2♀ KO: 4 mice, 2♂, 2♀	p < 0.0001, t = 11.03, df = 7	
	f-ABR gCtr vs. cCtr f-ABR Gnai3 gKO vs. Gnai3 cKO		p = 0.97, t = 0.036, df = 9 p = 0.033, t = 2.65, df = 7	
Fig. 7E	wave IV/I ratio (click-ABR) Gnai3 gKO Gnai3 cKO	Ctr: 7 mice, 5♂, 2♀ KO: 9 mice, 7♂, 2♀ Ctr: 9 mice, 6♂, 3♀ KO: 7 mice, 3♂, 4♀	p = 0.44, F(1, 369) = 0.6 p < 0.0001, F(1, 358) = 132	2-way ANOVA followed by post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test

Supplemental Table 2

sFig. 3B	Gnai2 cKO			
	wave I amplitude	Ctr: 4 mice, 2♂, 2♀ KO: 5 mice, 3♂, 2♀	p = 0.744, F(1, 251) = 0.11	2-way ANOVA followed by post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test
	wave I neg. peak latency		p = 0.218, F(1, 242) = 1.52	
	slope of the amplitude growth function		p = 0.848, t = 0.19, df = 16	2-tailed unpaired Student's t-test
sFig. 3C	Gnai2 cKO			
	wave IV amplitude	Ctr: 4 mice, 2♂, 2♀ KO: 5 mice, 3♂, 2♀	p = 0.814, F(1, 258) = 0.05	2-way ANOVA followed by post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test
	wave IV neg. peak latency		p = 0.243, F(1, 248) = 1.37	
	slope of the amplitude growth function		p = 0.852, t = 0.19, df = 16	2-tailed unpaired Student's t-test
sFig. 3D	Gnai2 cKO wave IV/I ratio	Ctr: 4 mice, 2♂, 2♀ KO: 5 mice, 3♂, 2♀	p = 0.338, F(1, 240) = 0.92	2-way ANOVA followed by post-hoc pair-wise Bonferroni's multiple comparison test

Supplemental Table 3

Basal cochlear turn outer hair cells			
Age	Genotype	Length of stereocilia (μm)	Number of stereocilia
		median (range) <i>N</i> = number of independent repetitions	median (range) <i>N</i> = number of independent repetitions
P21	Ctr	1.44 (0.73–2.05) <i>N</i> = 20	94.4 (72–119) <i>N</i> = 12
	stereocilia / cells / mice	272 / 64 / 4	8299 / 87 / 5
P21	Gnai3 cKO	0.92 (0.82–1.44) (*) <i>N</i> = 11	73.1 (46–86) (*) <i>N</i> = 14
	stereocilia / cells / mice	305 / 64 / 4	7621 / 106 / 4
	<i>Non-parametric Mann Whitney test</i>	<i>p</i> = 0.0107	<i>p</i> = 0.0001

Résultats complémentaires

Résultats complémentaires :

Le complexe Crumbs3/Pals1/Mpdz exprimé à la surface apicale des CC participe à la polarité, la maturité et la fonction des CC.

(résultats complémentaires non publiés)

Introduction

Nos précédentes études mettent en avant toute l'importance du complexe Gpsm2/Gai3 sur la fonction auditive (Ezan et al., 2013; Mauriac et al., 2017). Nous avons démontré que ce complexe est indispensable à la migration translationnelle du kinocil. Dans cette fonction, la localisation asymétrique dans le plan des protéines Gpsm2 et Gai3 à la surface apicale de la CC est nécessaire. Cependant, aucune donnée n'existe sur les protéines permettant le recrutement et la stabilité de ce complexe à la surface apicale des CC. Nous pensons que les protéines des complexes apicaux interviendraient dans cette fonction. La mise en place de la polarité apicale fait intervenir deux complexes apicaux, le complexe Crumbs et le complexe Par. Notre précédente étude met en évidence que les protéines Par6 et aPKC, composant le complexe Par, sont exprimées au pôle proximal à la surface apicale des CC. Ce profil d'expression, opposé à celui des protéines Gpsm2 et Gai3, suggère que le complexe Par ne joue pas un rôle essentiel dans le recrutement et le maintien des protéines Gpsm2 et Gai3 à la surface apicale des CC. De façon intéressante, nos données préliminaires démontrent une expression homogène de la protéine Crumbs3 à la surface apicale de la CC, et l'absence de cette protéine semble engendrer une perturbation de l'expression de Gai3 dans cette région. Nous avons donc émis l'hypothèse d'un lien entre les protéines du complexe Crumbs et les protéines du complexe Gpsm2 et Gai3.

De récentes publications suggèrent que *Mpdz*, un des membres du complexe Crumbs, serait un nouveau gène candidat pour les surdités chez la souris et l'homme (Bowl et al., 2017; Shaheen et al., 2017). *Mpdz*, ou HYC2, est par ailleurs connue pour être à l'origine d'hydrocéphalies congénitales récessives sévères (Al-Dosari et al., 2013; Al-Jezawi et al., 2018; Shaheen et al., 2017). De façon intéressante, *Mpdz* forme avec *Daple* (HYC1) et *WDR81* (HYC3) une famille de protéines à l'origine d'hydrocéphalies congénitales similaires (HYC). De plus, la mutation de *WDR81* semble causer des surdités chez certains patients (Cappuccio et al., 2017; Komara et al., 2016). A ce jour, aucun cas clinique ne mentionne de déficit auditif chez des patients atteints d'une mutation pour *Daple*, bien que des études chez des souris mutantes démontrent des anomalies morphologiques de l'épithélium auditif (Siletti et al., 2017) et des déficits auditifs dans les hautes fréquences (Bowl et al., 2017).

Au vu de ces données, nous pensons donc que (1) les protéines du complexe Crumbs participent à un complexe apical comprenant Gpsm2/Gai3/Daple/WDR81 mais aussi que (2) les protéines du complexes Crumbs et les protéines HYC seraient essentielles à la maturation des CC et à la fonction auditive.

Objectifs

Notre objectif à long terme est de mettre en évidence les mécanismes moléculaires et cellulaires essentiels à la mise en place de la polarité des CC. Pour cela, nous avons pour objectif de (1) découvrir le profil d'expression spatio-temporel des protéines du complexe Crumbs et HYC, (2) déterminer les anomalies structurelles et fonctionnelles lors de l'absence de certaines protéines de ces complexes, et (3) mettre en évidence des liens protéiques entre les complexes Gpsm2/Gai3, Crumbs et HYC.

Matériels & Méthodes

Animaux : Deux lignées d'animaux transgéniques ont été utilisés : *Mpdz^{Foxg1}* et *Mpdz^{Emx1}*. Ces animaux ont été obtenus par le croisement de souris Flox-Mpdz (obtenues de notre collaborateur Andreas Fisher, Heidelberg en Allemagne (Feldner et al., 2017b)) avec des souris Foxg1-Cre ou Emx1-Cre. Après croisement, ces lignées expriment une protéine tronquée correspondant au premier domaine L27 de la protéine Mpdz (*figure 2*). Entre E9,5 et E10,5, les lignées Foxg1-Cre, expriment la Cre dans le télencéphale et l'otocyste, alors que les lignées Emx1-Cre expriment la Cre dans le télencéphale dorsal dès E10,5. Les souris Swiss et les rats Sprague Dawley proviennent de chez Janvier Labs. Les cochlées de souris *Crumbs3* KO nous ont été données par le Dr Margolis de l'université du Michigan aux USA.

Immunomarquage sur cochlée : Les oreilles internes de rat ou de souris ont été prélevées à des stades de développement bien précis entre P0 et P11. Les oreilles internes ont été disséquées dans du Phosphate-buffered Saline (PBS) 1X et fixées pendant 1 heure 30 à 4°C dans du PFA 4% supplémenté avec 10% de sucrose. Après des rinçages au PBS 1X, les oreilles internes ont été disséquées afin d'isoler l'organe de Corti. Cet épithélium a ensuite été perméabilisé et saturé avec 5% de sérum bovin (Bovin Serum Albumin (BSA)) diluée dans du PBS 1X avec 0,25% de triton X-100 pendant 2 heures à température ambiante. L'anticorps primaire dilué dans du PBS 1X a été incubé sur la nuit à 4°C. Le lendemain, après plusieurs rinçages au PBS 1X, les cochlées ont été incubées avec les anticorps secondaires et la phalloïdine (marquage de l'actine-F) dilués dans du PBS 1X pendant 30 minutes à température ambiante. Les anticorps utilisés ont été les suivants : anti-Gai3 (obtenu auprès de notre collaborateur Bernd Nürnberg, Tübingen en Allemagne – produit chez le lapin), anti-Gpsm2 (produit chez le lapin par Mireille Montcouquiol et précédemment caractérisé (Ezan et al., 2013)), anti-Crumbs3 (obtenu auprès de notre collaborateur André Le-Bivic, Marseille, France – produit chez le lapin), anti-Patj (obtenu auprès de notre collaborateur André Le-Bivic, Marseille, France – produit chez le lapin), anti-Mpdz (produit chez la souris, BD biosciences), anti-Pals1 (produit chez la souris – Santa Cruz), anti-

Pals1 (produit chez la lapin – Santa Cruz), anti-ZO1 (produit chez la souris – Thermo Fisher Scientific), anti- β 2-spectrin (produit chez la souris – BD transduction), anti-souris Alexa Fluor 488 (produit chez la chèvre - Jackson ImmunoResearch), anti-lapin Alexa Fluor 594 (produit chez la chèvre - Jackson ImmunoResearch), ou Phalloidin-ATTO647N (Sigma). Afin de comparer les cochlées contrôles et les cochlées de souris transgéniques de la même condition, les cochlées ont été incubées dans un même tube. Après immunomarquage, les cochlées ont été placées entre lame et lamelle dans du milieu de montage anti-affadissement approprié à l'acquisition d'images au microscope confocal (Prolong Gold antifade reagent, Life Technologies). Pour l'acquisition des images, nous avons utilisé un microscope confocal et l'analyse a ensuite été faite sur le logiciel ImageJ.

Culture, transfection et immunomarquage des cellules COS-7 : Les cellules COS-7 (dérivées de la lignée cellulaire de fibroblastes issus de reins de singes vert d'Afrique) sont cultivées à 37°C en présence de 5 % de CO₂ dans du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) complet (sérum de veau fœtal 10 %, L-glutamine 2mM, pénicilline 50U, streptomycine 50U), sur des lamelles de verre. Les cellules ont été transfectées en utilisant du PEI (polyéthylèneimine). Pour nos expériences, nous avons transfecté entre 0,25 et 4 μ g des constructions plasmidiques suivantes : venus-Gpsm2, Flag-Mpdz, myc-Pals1. Après 48 heures, les cellules ont été fixées pendant 15 minutes avec 4% de PFA à température ambiante, puis perméabilisées et saturées avec du PBS 1X contenant 0.25% de Triton X-100 et 10% de sérum de chèvre pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules ont été ensuite incubées 1 heure avec les anticorps primaires puis 45 minutes avec les anticorps secondaires dilués dans du PBS 1X à température ambiante. Les anticorps utilisés ont été les suivants : anti-myc 9E10 (produit chez la souris, Biolegend), Anti-Flag (produit chez le lapin – Sigma), anti-souris Alexa Fluor 594 (produit chez la chèvre - Jackson ImmunoResearch), anti-lapin Alexa Fluor 594 (produit chez la chèvre - Jackson ImmunoResearch). Les lamelles ont été montées sur des lames de verre avec un milieu de montage anti-affadissement, de type Fluoromont (Southern Biotech). L'acquisition des images a été réalisée avec un microscope à fluorescence Zeiss et les images acquises ont été analysées avec le logiciel Image J.

Culture des HEK293T et Immunoprécipitation : Des cellules HEK293T (cellules rénales embryonnaires humaines) ont été cultivées dans un milieu enrichi à 5% de CO₂ à 37°C et transfectées avec du PEI 24 heures après leur ensemencement. Pour cela, entre 4 à 6 μ g des plasmides venus-Gpsm2, Flag-Mpdz et myc-Pals1 ont été utilisés. Après 48 heures d'expression, les cellules ont été broyées puis soniquées avant d'être solubilisées avec du Tris HCl 50mM pH8

additionné à 1% d'acide désoxycholique (Deoxycholic Acid (DOC)) à 37°C pendant 45 minutes sous agitation puis avec 1% de Triton X-100 15 minutes à 37°C sous agitation. Des inhibiteurs de protéases (Complete EDTA Free) ont été additionnés au milieu afin de limiter la dégradation protéique. Après cette incubation, les cellules ont été centrifugées à 35000 rpm pendant 40 minutes à 4°C afin de récupérer les protéines d'intérêt dans le surnageant. Ce surnageant a alors été incubé sur la nuit à 4°C sur des billes GFP magnétiques afin de fixer nos protéines possédant un tag GFP liées avec leurs potentiels interacteurs. Le lendemain, les billes ont été intensivement rincées avec une solution de TrisHCl, NaCl et Triton X-100. Puis, du tampon 2X Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) contenant du β -mercaptoéthanol est ajouté sur la résine, l'ensemble est chauffé pendant 5 minutes à 95°C, et vortexé, afin de décrocher les complexes de protéines des billes. L'analyse a ensuite été faite sur un gel de western blot dénaturant SDS-PAGE. Pour l'immunoblot nous avons utilisé les anticorps suivants : anti-GFP (produit chez la souris – Clontech), anti-myc 9E10 (produit chez la souris, Biolegend), anti-Flag (produit chez le lapin – Sigma), anti-lapin-HRP (horseradish peroxidase – Jackson ImmunoResearch), anti-souris-HRP (horseradish peroxidase – Jackson ImmunoResearch). Le chemidoc MP (BioRad) nous a permis de faire une lecture de nos membranes.

Histologie : Des cerveaux de souris contrôles et *Mpdz^{Emx1}* ont été perfusés et prélevés avant d'être sectionnés au vibratome (coupes coronales de 40 μ m). Nous avons réalisé un marquage à l'aide d'un kit permettant de visualiser la myéline et les noyaux des neurones (Brain Imaging Kit – ThermoFisher Scientific). Nous avons utilisé un anticorps anti-Mpdz (produit chez la souris, BD Bioscience) afin de visualiser l'expression endogène de cette protéine au niveau cérébral. Les images ont été acquises avec le Nanozoomer Hamamatsu ou un microscope à épifluorescence.

Résultats

- Mpdz et Pals1 semblent co-localiser avec Gpsm2 et Gai3 à la surface apicale de la CC

Dans les cellules épithéliales de mammifères, la protéine Crumbs3 est exprimée à la membrane plasmique et aux TJ (Roh et al., 2003). Nos premiers résultats mettent en évidence une expression de Crumbs3 de façon homogène à la surface apicale de la CC tout en étant exclue des jonctions des CC et de la surface apicale des SC (*figure 24A-B*). De façon surprenante, Patj ne semble pas être exprimée dans les CC mais à la surface apicale et aux jonctions intercellulaires des CS (*figure 24C-D*). En revanche, Mpdz, homologue de Patj chez les mammifères, semble être enrichie de façon asymétrique au pôle distal de la surface apicale des CC de façon similaire aux protéines Gpsm2 et Gai3, ainsi qu'aux TJ (*figure 24E-F*). Nous avons obtenu une co-

localisation de Mpdz avec Gpsm2 et G α 3 à la surface apicale et au niveau des TJ en partie distale de la CC (données non montrées).

Quant à Pals1, elle possède un profil d'expression similaire à Mpdz à la surface des CC et aux TJ (*figure 24G-H et figure 25A-F*) et co-localise avec G α 3 (*figure 25G-H*) et Gpsm2 (donnée non montrée). L'expression de Mpdz et Pals1 au pôle distal apical de la CC, fait de ces protéines de bons candidats pour interagir avec Gpsm2 et G α 3 à la surface apicale de la CC. La co-localisation de Mpdz avec Pals1 et non Patj suggère qu'un complexe Crumbs3/Pals1/Mpdz participe à la mise en place de la polarité A-B des CC, et non un complexe Crumbs/Pals1/Patj, plus classique.

Une analyse du profil d'expression de Mpdz sur un nombre d'échantillons limités à P11, suggère que cette protéine n'est pas relocalisée au sommet des stéréocils (*figure 26A-D*). Nous devons refaire cette expérience pour valider ce résultat.

- La délétion des membres du complexe Crumbs semble affecter la morphologie et la cohésion de la touffe ciliaire

L'analyse de l'épithélium auditif de souris mutées pour *Crumbs3* (*Crumbs3 KO*) met en évidence des anomalies structurales caractérisées par une perturbation de la morphologie et de la cohésion de la touffe ciliaire (*figure 27A-B*). Nous avons aussi observé une diminution de l'expression de G α 3 à la surface apicale de la CC en absence de Crumbs3, suggérant un lien entre ces protéines (*figure 27C-D*). Ces cochlées provenant de souris *Crumbs3 KO* nous ont été envoyées déjà fixées par l'équipe du Dr Magolis aux USA. Par conséquent, nous avons eu accès à peu de cochlées pour cette analyse.

La mutation conditionnelle de *Mpdz* (*Mpdz^{Foxg1}*) semble conduire à des résultats similaires, avec la présence de touffes ciliaires plates, souvent mal orientées avec des stéréocils non cohésifs (*figure 28B,D,F,H*). Nous avons dans un premier temps validé l'absence d'expression de Mpdz chez les souris *Mpdz^{Foxg1}* (*figure 28A-B*). Bien que les protéines Gpsm2 et G α 3 soient présentes à la surface apicale des CC, nous observons une diminution de l'intensité de fluorescence de ces deux protéines (avec les mêmes paramètres d'acquisition), ce qui laisse suggérer une perturbation de la stabilité ou du recrutement de ces protéines à la membrane apicale en absence de Mpdz (n=2) (*figure 28C-F*). Cette diminution est d'ailleurs assez similaire à celle observée pour G α 3 dans le mutant *Crumbs3 KO*.

De façon plus étonnante, nous avons observé une perte presque totale d'expression de Pals1 à la surface apicale des CC chez les souris *Mpdz^{Foxg1}* (figure 28G-H). A un stade de développement plus tardif (P11), l'altération de l'épithélium auditif reste toujours visible chez le mutant *Mpdz^{Foxg1}* (figure 26E-F). De plus, la localisation de *Gpsm2* au sommet des stéréocils ne semble pas être impactée par la mutation de *Mpdz* (figure 26E-F). Contrairement à une mutation de *Gpsm2* ou *Gnai3*, sur les images obtenues en confocal, nos résultats préliminaires ne semblent pas mettre en évidence de différences de longueur de stéréocils chez ces souris (n=2) par rapport aux souris contrôles (figure 26G). Cependant, une analyse sur des images en microscopie électronique à balayage serait nécessaire afin de valider ce résultat.

- *Mpdz* semble être indispensable à la fonction auditive

Afin de déterminer un déficit fonctionnel chez les souris *Mpdz^{Foxg1}*, des tests auditifs (ABR – Auditory Brainstem Response) ont été réalisés (figure 29A). Nos résultats préliminaires mettent en évidence une réduction du seuil auditif pour toutes les fréquences à deux stades de développement (P21 et P50) chez les souris *Mpdz^{Foxg1}* par comparaison aux souris contrôles (figure 29A). De plus, une réduction de l'amplitude et une augmentation du temps de latence de la première onde suggèrent une altération synaptique à la base de la CC (figure 29B-C). Les mesures des DPOAEs suggèrent que la fonction des CCE sur l'amplification des ondes est affectée (figure 29D).

- Pals1 serait-il un nouvel interacteur de *Gpsm2* ?

Pour déterminer de façon simple d'éventuelles interactions entre les diverses protéines de nos complexes, nous avons utilisé des cellules hétérologues COS-7. Dans un premier temps, comme contrôle positif, nous avons validé la co-localisation des protéines *Mpdz* et *Pals1*, dont l'interaction est connue (donnée non montrée). Les simples transfections de ces plasmides mettent en évidence un co-marquage à la fois membranaire et jonctionnel des deux protéines (figure 30A,C). Par la suite, nous avons co-transfecté *Mpdz* et un plasmide codant pour *Gpsm2* mais nous n'avons pas observé de co-localisation (figure 30B). Par contre, dans la même série d'expériences, nous avons observé une co-localisation de *Gpsm2* et *Pals1* ce qui suggérerait une interaction entre ces deux protéines (figure 30D). Par immunoprécipitation, nous avons confirmé à la fois l'interaction entre *Gpsm2* et *Pals1*, et l'absence d'interaction entre *Mpdz* et *Gpsm2* (figure 30E-G).

- Mpdz semble avoir une expression synaptique et la délétion de *Mpdz* semble conduire à une hypoplasie du corps calleux

Un immunomarquage endogène de Mpdz sur des coupes coronales de cerveau de souris à P21 met en évidence un enrichissement de cette protéine au niveau des cellules épendymaires (donnée non montrée). Ce résultat est en accord avec les travaux du Dr Feldner et la fonction de cette protéine dans ces cellules (Feldner et al., 2017b). Le marquage de cette protéine au niveau de l'hippocampe suggère une expression synaptique (*figure 31A*). On peut donc penser que cette protéine est indispensable pour le développement cérébral. Afin de valider cette hypothèse, nous avons réalisé une analyse morphologique du cerveau chez des souris *Mpdz^{Emx1}*. Dans un premier temps, nous avons validé par western blot une diminution de l'expression de Mpdz chez ces souris par rapport aux souris contrôles (*donnée non montrée*). Notre analyse morphologique du cerveau suggère une hypoplasie du corps calleux chez les souris *Mpdz^{Emx1}* par comparaison à des souris contrôles (n=1) (*figure 31B-D*). Cependant, des analyses complémentaires sont à prévoir afin de valider ce phénotype.

Conclusion

Nos données préliminaires montrent que *Mpdz* est indispensable à la fonction auditive. Nos premiers résultats suggèrent que les complexes Crumbs et Gpsm2/Gai3 pourraient être liés par le biais d'une interaction entre Gpsm2 et Pals1, et participeraient ensemble à la polarité et/ou à la morphogénèse apicale des CC. Nos données originales démontrent pour la première fois un rôle du complexe Crumbs dans la fonction auditive. De plus, notre analyse morphologique du cerveau chez une souris mutée pour *Mpdz* suggère une hypoplasie du corps calleux. Tout comme Gpsm2, *Mpdz* pourrait être à l'origine d'une surdité syndromique caractérisée par des surdités et des anomalies cérébrales.

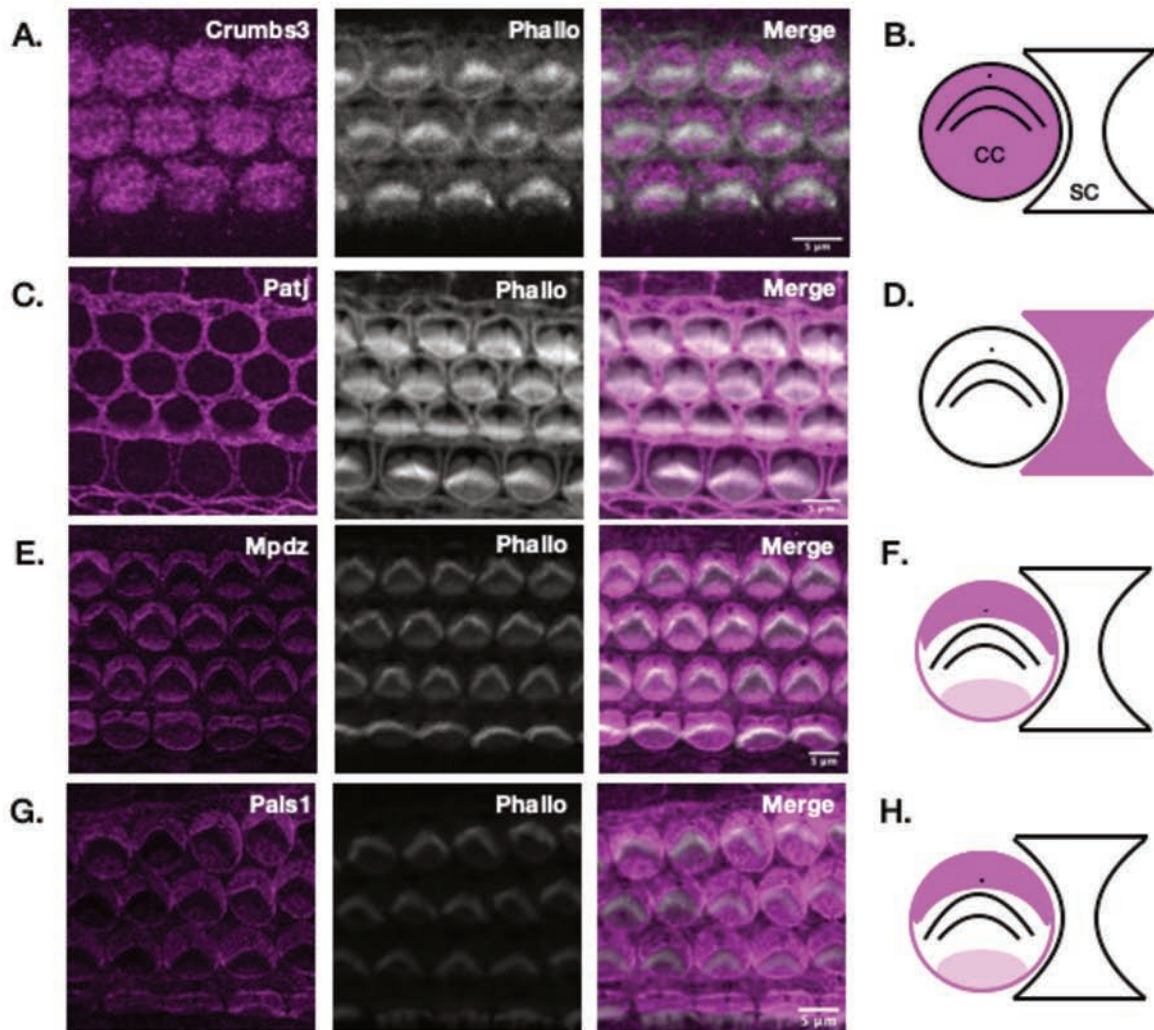


Figure 24 : Les protéines du complexe Crumbs sont exprimées dans l'organe de Corti. (A, C, E, G) Vue de surface à P0 de l'épithélium auditif immunomarcqué avec des anticorps anti-Crums3 (A), anti-Patj (C), anti-Mpdz (E) et anti-Pals1 (G) (magenta) avec de la phalloïdine (gris) ; (B, D, F, H) Représentation schématique du profil d'expression des protéines Crums3 (B), Patj (D), Mpdz (F) et Pals1 (H) à la surface apicale de l'organe de Corti. CC : Cellule ciliée ; CS : Cellule de soutien. Echelle : 5μm.

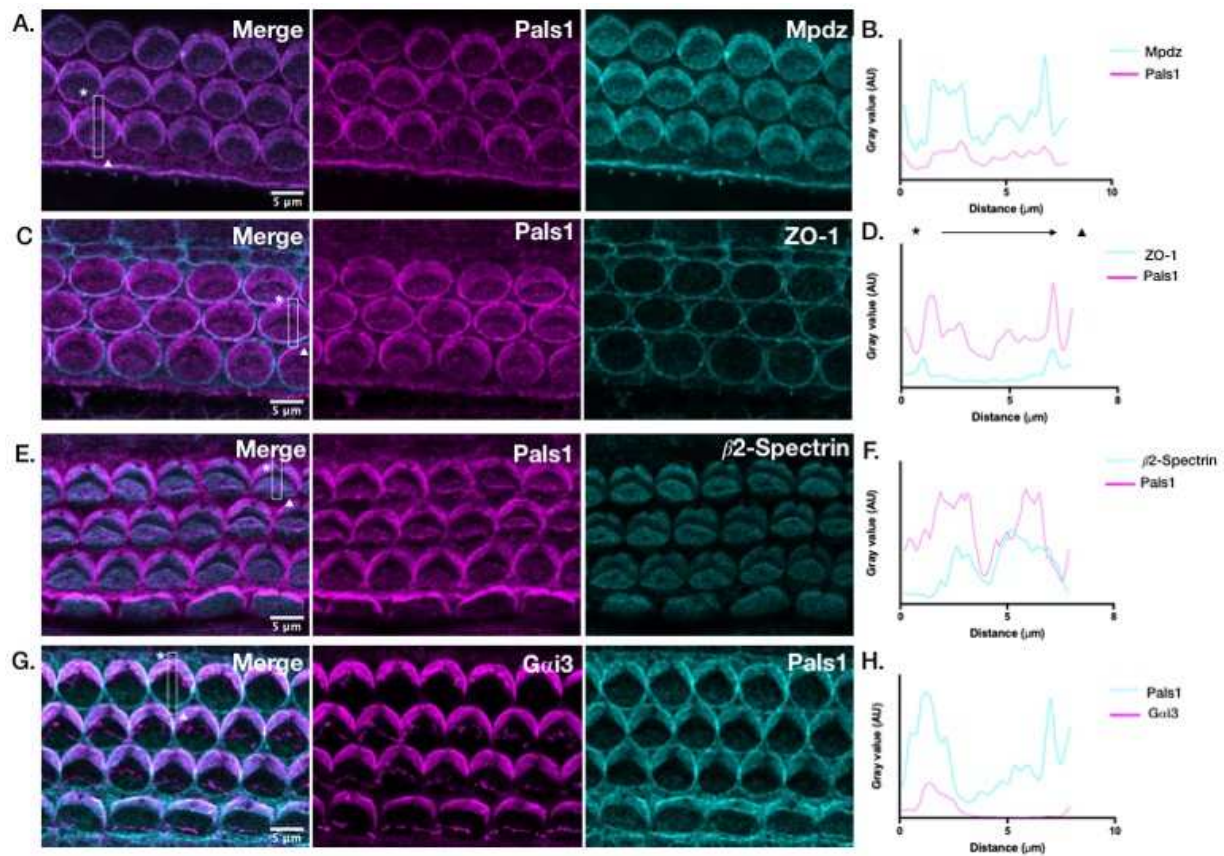


Figure 25 : Mpdz et Pals 1 présentent un profil d'expression similaire dans les CC. (A, C, E, G) Vue de surface à P0/P1 de l'épithélium auditif. **(A-B)** Un immunomarquage avec des anticorps anti-Pals1 (magenta) et anti-Mpdz (cyan) **(A)** et une mesure par line scan de l'intensité de fluorescence (correspondant au rectangle blanc) sur l'image A **(B)** mettent en évidence une co-localisation de Mpdz avec Pals1 à la surface apicale de la CC ; **(C-D)** Un immunomarquage avec des anticorps anti-Pals1 (magenta) et anti-ZO1 (TJ - cyan) **(C)** et une mesure par line scan de l'intensité de fluorescence correspondant au rectangle blanc sur l'image C **(D)** suggèrent une expression de Pals1 aux TJ ; **(E-F)** Un immunomarquage avec des anticorps anti-Pals1 (magenta) et anti- β 2-spectrin (plaque cuticulaire - cyan) **(E)** et une mesure par line scan de l'intensité de fluorescence correspondant au rectangle blanc sur l'image E **(F)** suggèrent une expression de Pals1 au domaine apical de la CC ; **(G-H)** Un immunomarquage avec des anticorps anti-Gai3 (magenta) et anti-Pals1 (cyan) **(G)** et une mesure par line scan de l'intensité de fluorescence correspondant au rectangle blanc sur l'image G **(H)** mettent en évidence une co-localisation de Gai3 avec Pals1 à la surface apicale de la CC. Etoile (*) : Point de départ de la mesure par line scan ; Triangle : point de fin de la mesure par line scan. Echelle : 5 μ m.

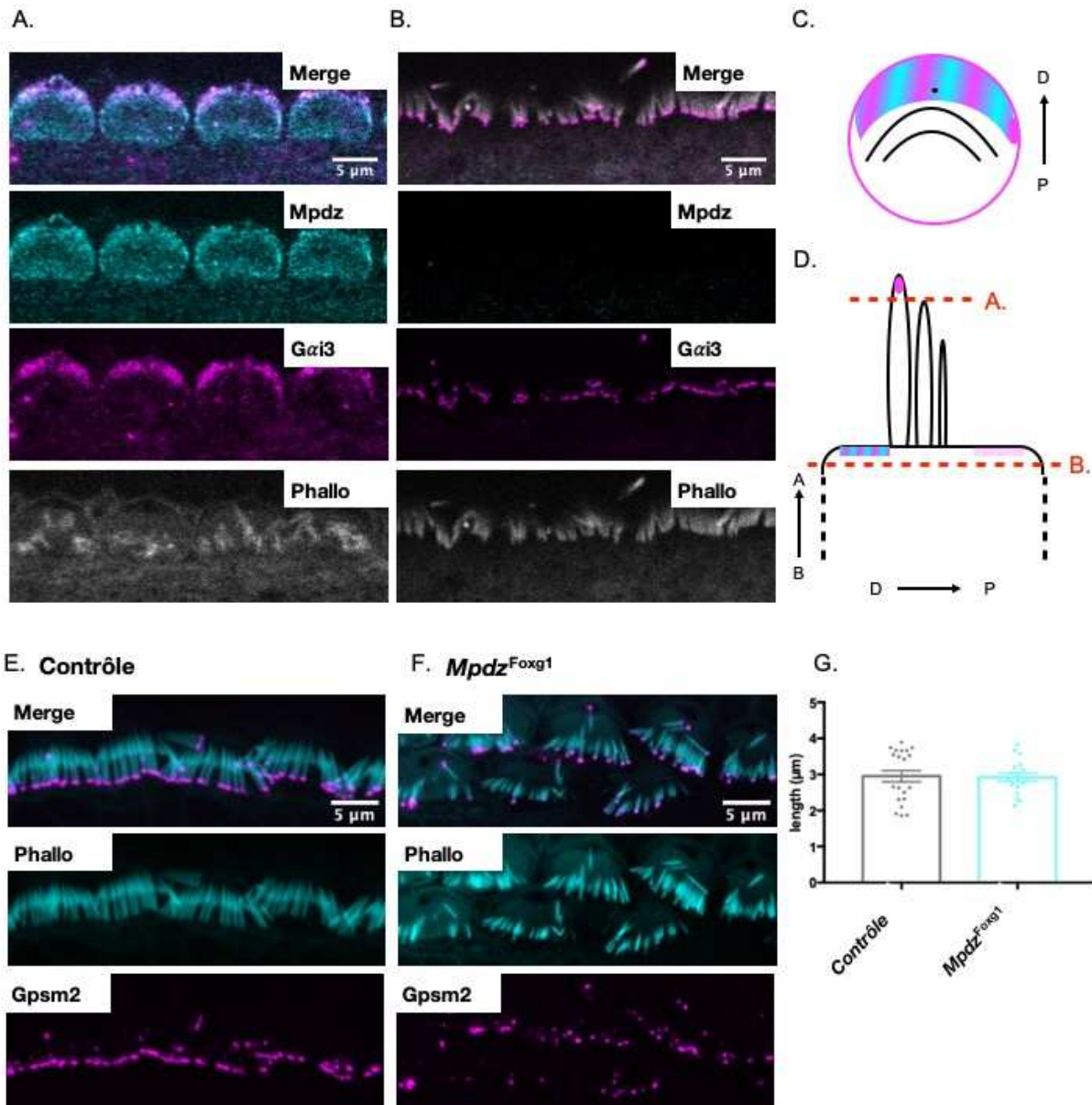


Figure 26 : Mpdz est exprimée à la surface apicale des CC à P11. (A-B ; E-F) Vue de surface de l'épithélium auditif à P11. **(A-B)** Un immunomarquage de Mpdz (cyan) et de Gai3 (magenta) avec de la phalloïdine (gris) suggère une expression à la surface apicale de Mpdz et Gai3 **(A)**, et une expression de Gai3 au sommet des stéréocils **(B)** ; **(C)** Représentation schématique d'une vue de surface d'une cellule ciliée (CC) avec le profil d'expression des protéines Mpdz et Gai3 observé sur les images A et B ; **(D)** Représentation schématique des plans d'acquisitions des images confocales prises en A et B ; **(E-F)** Vue de surface de l'épithélium auditif à P11 d'une souris contrôle et d'une souris *Mpdz^{Foxg1}*. Un immunomarquage de Gpsm2 avec de la phalloïdine montre l'expression de Gpsm2 au sommet des stéréocils chez les souris contrôles **(E)** et les souris *Mpdz^{Foxg1}* **(F)** ; **(G)** Les premières quantifications (n=1) sur ces images ne mettent pas en évidence une différence de longueur des stéréocils entre les souris contrôles et les souris *Mpdz^{Foxg1}*. D : Distal ; P : Proximal. Echelle : 5 μm .

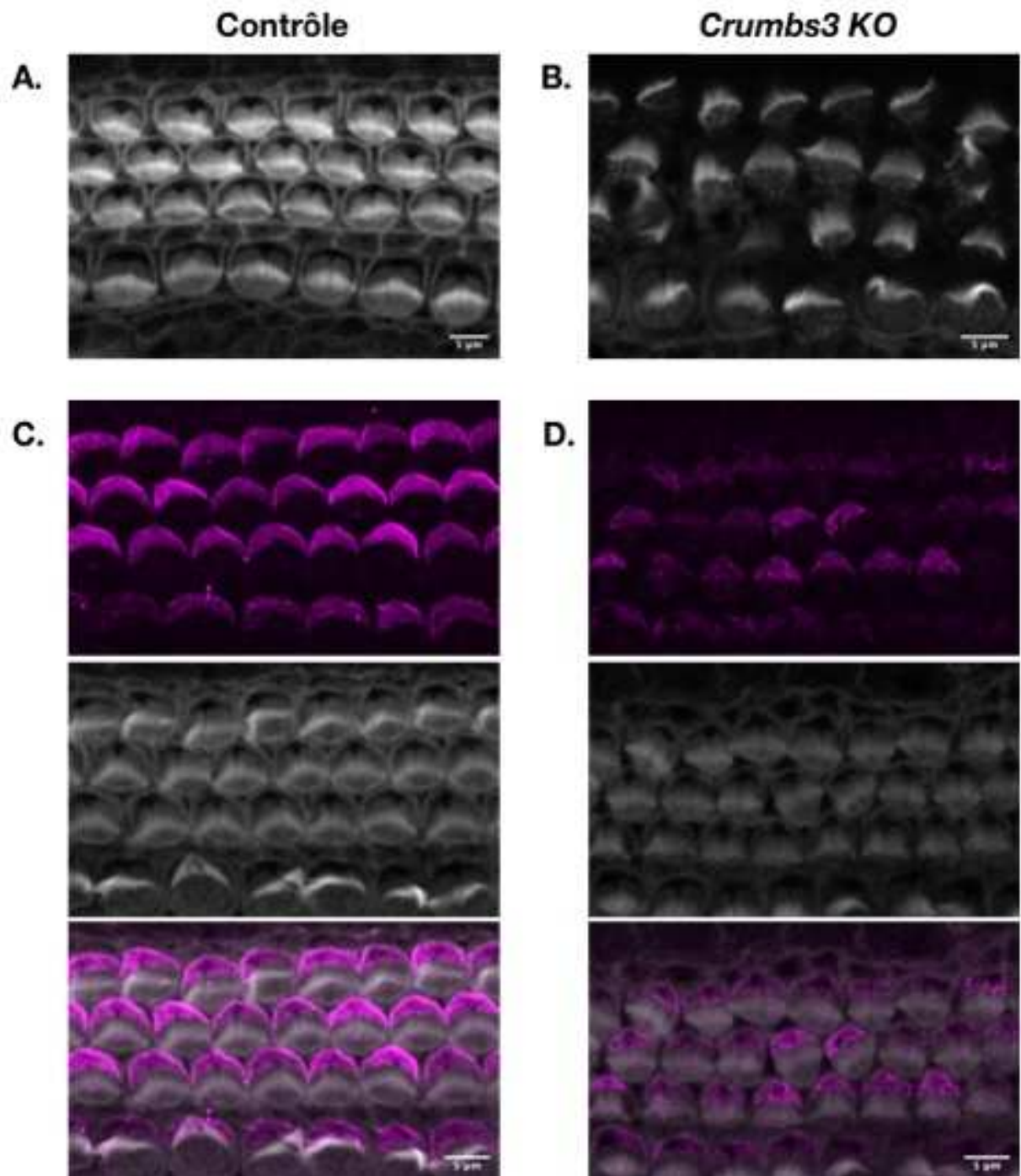


Figure 27 : La délétion de *Crumbs3* (*Crumbs3 KO*) perturbe la morphologie et la cohésion de la touffe ciliaire. (A-B) Vue de surface à E18,5 de l'épithélium cochléaire d'une souris contrôle (A) et d'une souris *Crumbs3 KO* (B) marqué avec de la phalloïdine ; (C-D) Vue de surface à E18,5 de l'épithélium cochléaire d'une souris contrôle (C) et d'une souris *Crumbs3 KO* (D) immunomarcqué avec un anti-Gai3 (magenta) et avec de la phalloïdine (gris). Echelle : 5 μ m.

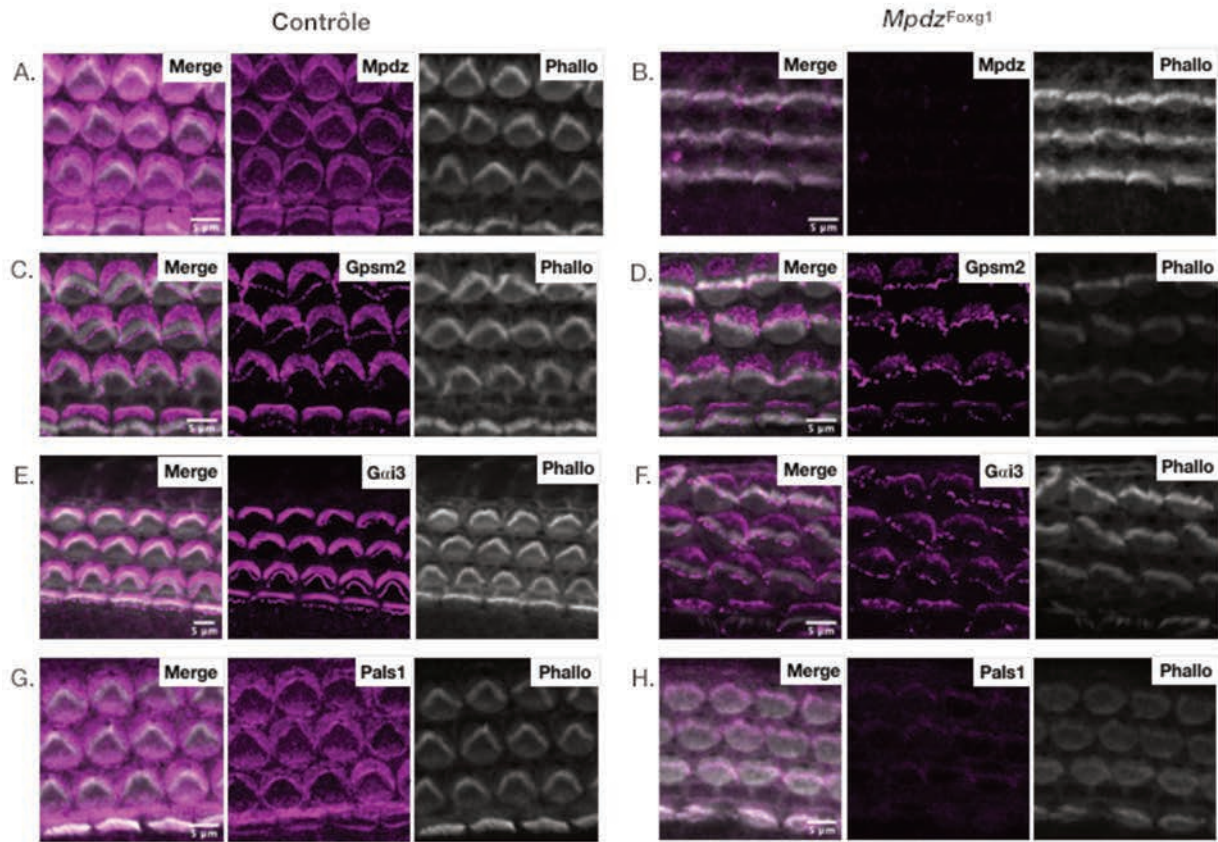


Figure 28 : La mutation de *Mpdz* semble affecter le profil d'expression de *Pals1*, *Gpsm2* et *Gai3*. (A-H) Vue de surface de l'épithélium auditif à P0/P1 chez une souris contrôle (A, C, E, G) ou une souris *Mpdz*^{Foxg1} (B, D, F, H) ; (A-B) Un immunomarquage de *Mpdz* (magenta) avec de la phalloïdine (gris) révèle une expression asymétrique distale à la surface apicale de la CC et aux jonctions de la CC chez une souris contrôle (A). On observe l'absence d'expression de *Mpdz* à la surface apicale de la CC chez la souris *Mpdz*^{Foxg1} (B) ; (C-D) Un immunomarquage de *Gpsm2* (magenta) avec de la phalloïdine (gris) révèle une expression de *Gpsm2* à la partie apicale distale de la CC et au sommet des stéréocils chez une souris contrôle (C). Le taux d'expression de *Gpsm2* semble être diminué à la surface apicale de la CC chez les souris *Mpdz*^{Foxg1} (D) ; (E-F) Un immunomarquage de *Gai3* (magenta) avec de la phalloïdine (gris) révèle une expression de *Gai3* à la partie apicale distale de la CC et au sommet des stéréocils chez une souris contrôle (E). Le taux d'expression de *Gai3* semble être diminué à la surface apicale de la CC chez les souris *Mpdz*^{Foxg1} (F) ; (G-H) Un immunomarquage de *Pals1* (magenta) avec de la phalloïdine (gris) révèle une expression asymétrique distale à la surface apicale de la CC et une expression aux jonctions de la CC chez une souris contrôle (G). L'expression de *Pals1* à la surface apicale et aux jonctions de la CC semble être drastiquement diminuée chez les souris *Mpdz*^{Foxg1} (H). Echelle : 5μm.

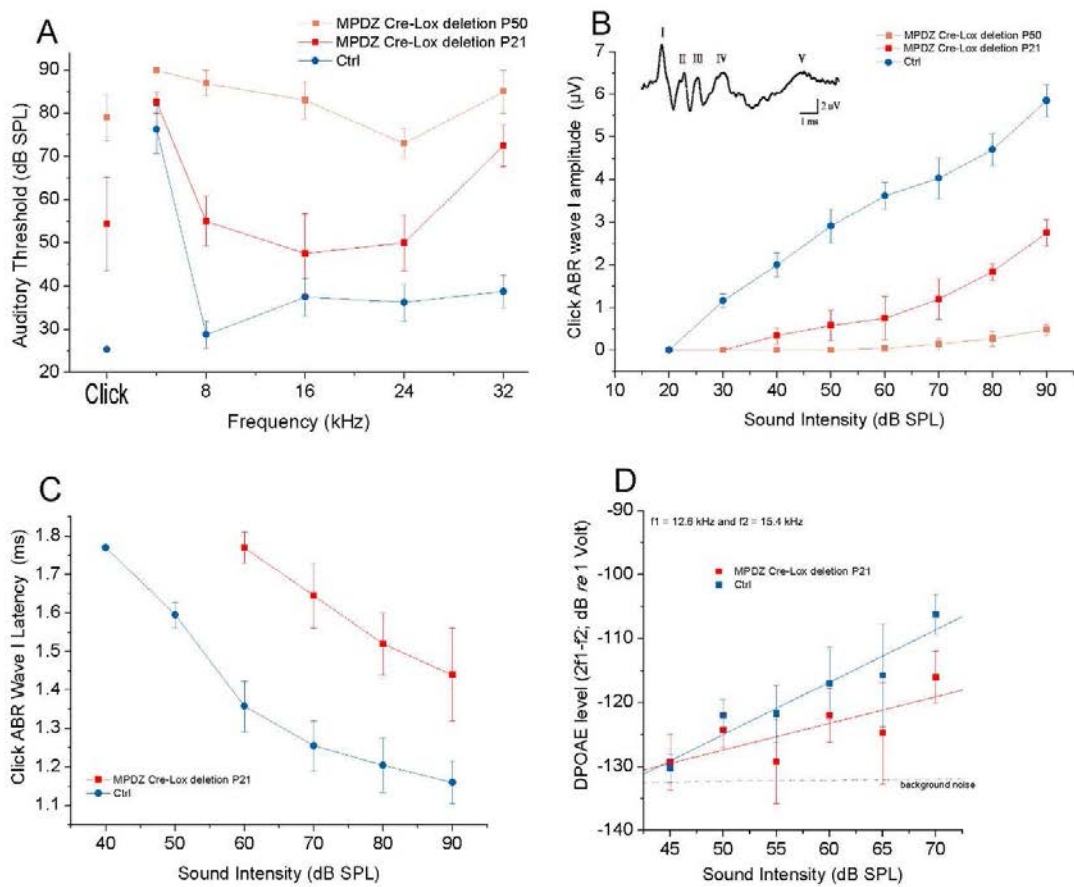


Figure 29 : Les tests auditifs effectués à P21 et P50 chez les souris $Mpdz^{Foxg1}$ semblent conduire à une surdité progressive et sévère. (A) Représentation graphique représentant le Click et le tone Auditory Brainstem Response (ABR). Ces mesures indiquent une augmentation progressive du seuil auditif ; (B) Représentation graphique de l'amplitude de l'onde I du Click ABR (réponse du nerf auditif) en fonction du niveau sonore. Ces mesures suggèrent une augmentation de l'amplitude de cette onde chez les souris $Mpdz^{Foxg1}$; (C) Représentation graphique de la latence de l'onde I sur les Click ABR en fonction du niveau sonore. Ces mesures suggèrent une augmentation de la latence de cette onde chez les souris $Mpdz^{Foxg1}$; (D) Représentation graphique des mesures DPOAEs (distorsion des otoémissions acoustiques). Ces mesures suggèrent que les CCE sont affectées chez les souris $Mpdz^{Foxg1}$ (Ctl, n=8 ; $Mpdz^{Foxg1}$, n=6).

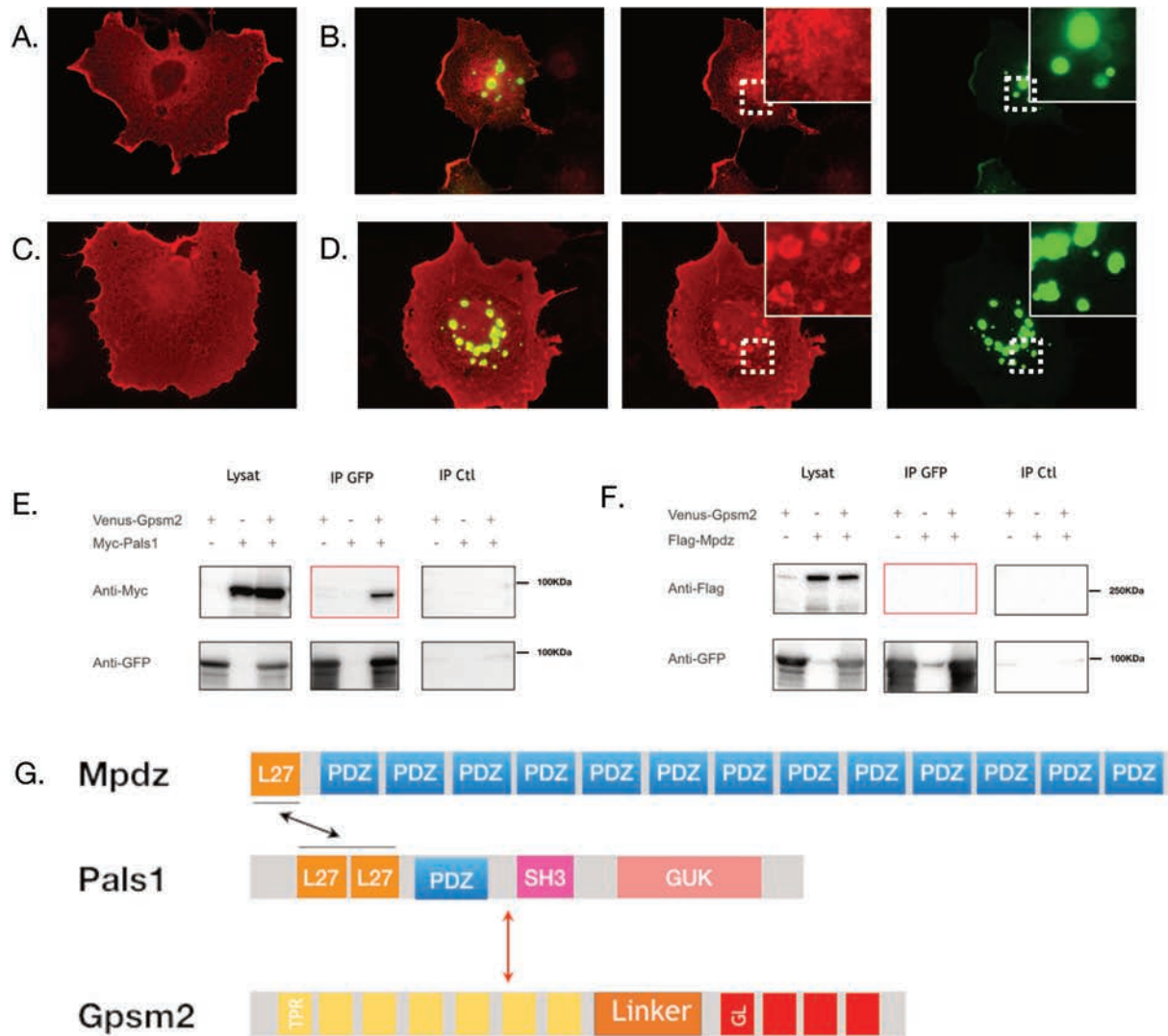


Figure 30 : Pals1 interagit avec Gpsm2. (A-B) Immunomarquage sur des cellules COS-7 transfectées avec le plasmide Flag-Mpdz seul (A), ou co-transfectées avec les plasmides Flag-Mpdz et Venus-Gpsm2 (B) ; (C-D) Immunomarquage sur des cellules COS-7 avec le plasmide Myc-Pals1 seul (C), ou co-transfectées avec les plasmides Myc-Pals1 et venus-Gpsm2 (D) ; (E) L'immunoprécipitation entre les constructions Venus-Gpsm2 et Myc-Pals1 montre une interaction entre ces deux protéines (encadré rouge) ($n > 3$) ; (F) L'immunoprécipitation entre les constructions venus-Gpsm2 et Flag-Mpdz suggère qu'il n'y a pas d'interaction entre ces deux protéines (encadré rouge) ($n = 3$) ; (G) Représentation schématique des protéines Mpdz, Pals1 and Gpsm2 avec une interaction connue (flèche noire) et une interaction que nous avons découverte (flèche rouge).

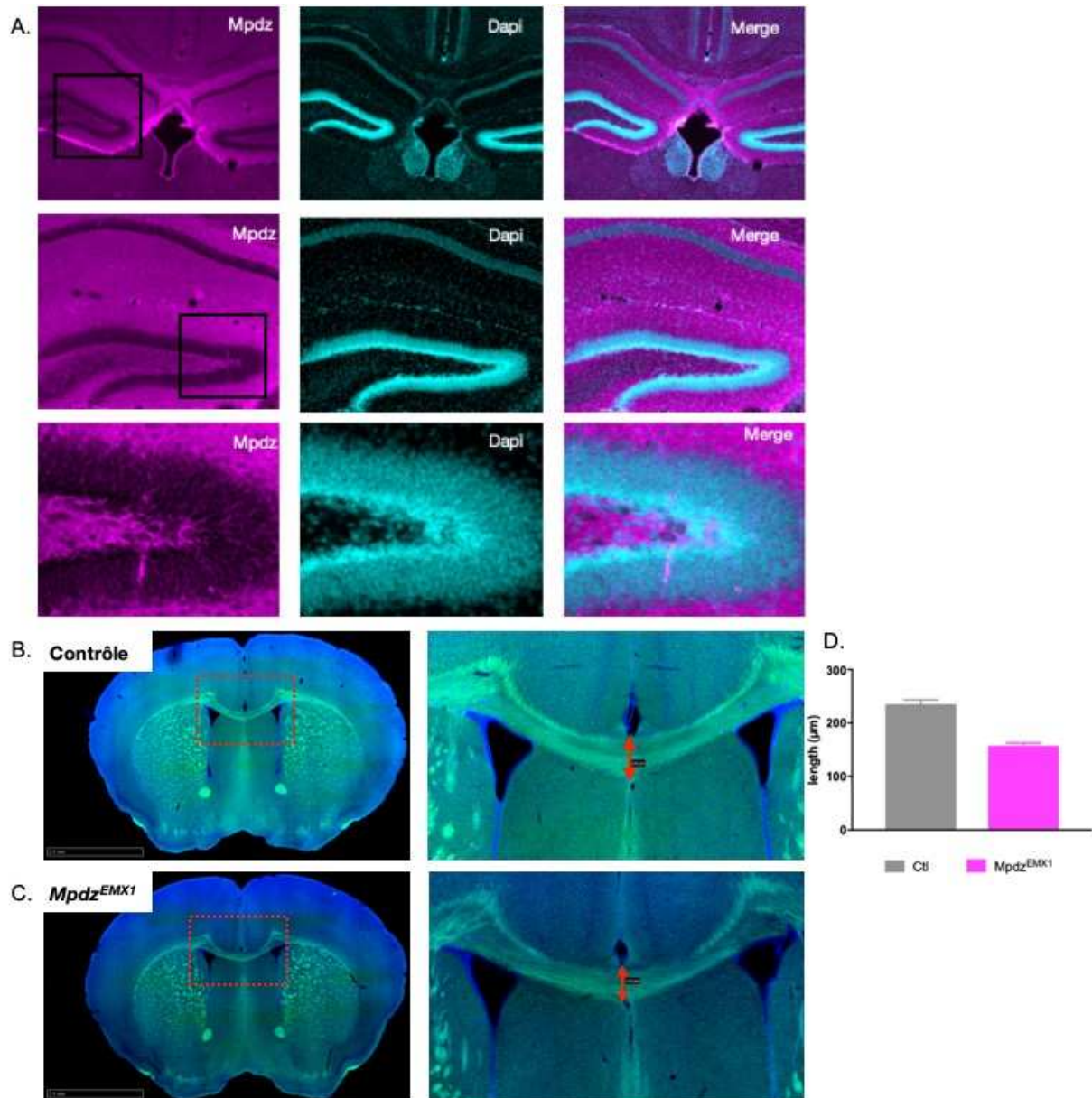


Figure 31 : L'analyse structurelle du cerveau des souris *Mpdz^{Emx1}* suggère une hypoplasie du corps calleux. (A) Immunomarquage de Mpdz (magenta) chez des souris contrôles. Ce marquage suggère un marquage synaptique de cette protéine ; (B-C) Marquage à P21 de la myéline (fibre axonale) et du DAPI (noyaux) sur des coupes coronales de souris contrôles (B) ou de souris *Mpdz^{Emx1}* (C) ; (D) Représentation graphique de l'épaisseur du corps calleux (flèche rouge) chez une souris contrôle (gris) et une souris *Mpdz^{Emx1}* (magenta). Ces données préliminaires suggèrent une réduction de l'épaisseur du corps calleux (n=1). Echelle : 2,5μm.

Discussion et perspectives

A. Gpsm2 : une protéine critique pour la polarité, la maturation et la fonction de la CC

Au début de ma thèse, la mutation de *GPSM2* était connue pour être associée au syndrome du Chudley McCullough (CMCS), une pathologie rare connue pour des surdités sévères et précoces associées à de nombreuses anomalies cérébrales et des troubles cognitifs (*tableau 2*) (Diaz-Horta et al., 2012; Doherty et al., 2012; Walsh et al., 2010). Les résultats obtenus pendant ces 4 ans ont permis de déchiffrer une base moléculaire pour cette pathologie, tout en identifiant un nouveau rôle moléculaire pour Gpsm2.

1. Rôle de Gpsm2 dans la maturation apicale de la CC

Initialement, le complexe Gpsm2/Gai3 a été identifié et décrit pour son rôle sur la modulation du cytosquelette de tubuline lors de la division asymétrique des cellules (Colombo et al., 2003). En 2013, notre équipe ainsi qu'une équipe canadienne ont démontré que très tôt au cours du développement (dès E15,5), le complexe Gpsm2/Gai3 acquiert une accumulation asymétrique distale à la surface apicale de la CC nécessaire à la migration translationnelle du kinocil (Ezan et al., 2013; Tarchini et al., 2013). Une mutation des gènes ou une absence d'expression des deux protéines de ce complexe, *in vivo* et *in vitro*, conduit à un phénotype PCP avec un mauvais positionnement du kinocil et des touffes ciliaires mal orientées et malformées. Ces études ont abouti à la découverte d'une autre voie de signalisation de la PCP intervenant dans des cellules post-mitotiques. Cette voie de signalisation, composée des protéines Gpsm2 et Gai3 a alors été appelée voie de la PCP dépendante des protéines Gi (Ezan et al., 2013).

Plus récemment, j'ai pu montrer la présence des protéines du complexe Gpsm2/Gai3 au sommet des stéréocils, avec un enrichissement progressif dès E17,5 jusqu'au stade adulte. Ce profil d'expression suggérait un rôle de ce complexe dans l'élongation des stéréocils, comme pour les protéines du complexe Myo15. En effet, les protéines Myo15, Whirlin et Eps8 composant ce complexe, sont présentes au sommet des stéréocils et jouent un rôle essentiel dans leur élongation et maturation (Belyantseva et al., 2005; Mogensen et al., 2007; Zampini et al., 2011). L'absence de l'une de ces protéines est à l'origine de stéréocils anormalement courts, plus épais, plus nombreux et de la perte de l'organisation en taille croissante des stéréocils. Ce phénotype est directement en lien avec des surdités chez la souris mais aussi chez l'homme. Notre analyse morphologique de l'épithélium auditif chez des souris mutées pour les gènes *Gpsm2* (*Gpsm2^{Foxg1}*) et *Gnai3* (*Gnai3^{Foxg1}*) a mis en évidence des stéréocils anormalement courts, plus épais, et la perte de l'organisation en taille croissante des stéréocils, similaires aux phénotypes observés dans les mutants *Myo15*, *Whirlin* et *Eps8*. Par conséquent, tout comme les protéines du complexe Myo15,

les protéines Gpsm2 et Gai3 sont essentielles à l'élongation et la maturation de la touffe ciliaire.

De façon identique aux mutants pour la *Myo15*, la *Whirlin* ou *Eps8*, des tests auditifs sur les mutants conditionnels *Gpsm2* (*Gpsm2^{Foxg1}*) démontrent une surdité précoce et sévère des souris dès 6 semaines. Des résultats similaires avaient été publiés préalablement par l'équipe du Dr Avraham chez les souris *LGN^{ΔC}* (Bhonker et al., 2016) puis confirmés par le Dr Tarchini chez les souris *LGN^{BF}* (Tarchini et al., 2016). Les souris *LGN^{BF}* et *Gpsm2^{Foxg1}* possèdent une mutation similaire aboutissant à la synthèse d'une forme tronquée de Gpsm2 exprimant uniquement les deux premiers domaines TPR. Quant à la souris *LGN^{ΔC}*, elle possède une mutation aboutissant à la synthèse d'une forme tronquée plus longue de Gpsm2 n'exprimant plus les domaines GoLoco en C-terminal (*figure 23*). La comparaison des épithéliums auditifs de ces trois souris mutantes suggère que les souris possédant l'expression des formes tronquées de Gpsm2 les plus courtes (*LGN^{BF}* et *Gpsm2^{Foxg1}*) possèdent aussi une altération de l'épithélium auditif plus sévère par rapport aux souris possédant l'expression d'une forme tronquée de Gpsm2 plus longue (*LGN^{ΔC}*). On peut donc penser l'existence d'un lien entre la taille de la forme tronquée de la protéine Gpsm2 et la sévérité du phénotype de l'épithélium auditif. Cependant, ces trois mutants différents ont tous un phénotype sévère de surdité précoce, suggérant une absolue nécessité de l'intégrité de la protéine. Ces observations suggèrent donc que l'altération de l'épithélium auditif n'est pas la seule origine de ces surdités.

Nous avons constaté que la mutation de *Gnai3* (*Gnai3^{Foxg1}*) engendre un phénotype moins sévère comparé à la mutation de *Gpsm2* (*Gpsm2^{Foxg1}*), non seulement d'un point de vue structurel mais aussi fonctionnel. En effet, la mutation de *Gpsm2* conduit à une longueur anormale de l'ensemble des stéréocils, contrairement à la mutation de *Gnai3* où des stéréocils de tailles normales persistent parmi les stéréocils anormalement courts au sein d'une même CC. En absence de *Gai3*, la sévérité de ce phénotype semble graduelle le long de l'axe tonotopique avec l'apex de l'organe de Corti moins affecté que la base (donnée non montrée). Ces résultats sont cohérents avec les résultats des tests auditifs qui montrent que les hautes fréquences sont plus affectées que les basses fréquences chez le mutant *Gnai3^{Foxg1}* (Mauriac et al., 2017). Ces observations suggèrent une compensation de la fonction de *Gai3* par une autre isoforme de cette protéine à l'apex de la cochlée. Grâce à une collaboration avec les Pr Nürnberg et Dr Rüttiger, nous avons validé une compensation de la fonction de *Gai3* par *Gai2* à l'apex de la cochlée (Beer-Hammer et al., 2018). Nous avons pu ainsi montrer que la mutation de *Gnai2* (*Gnai2^{Foxg1}*) ne perturbe pas la morphologie de l'épithélium auditif alors que la mutation simultanée des gènes *Gnai2* et *Gnai3* (*Gnai2/3^{Foxg1}*) engendre des stéréocils anormalement courts le long de l'axe

tonotopique, de façon similaire à la simple mutation de *Gpsm2*, mais de façon plus sévère que la simple mutation de *Gnai3*. Ces observations coïncident avec le profil d'expression de ces protéines observé le long de l'axe tonotopique. Nous avons ainsi montré que *Gai3* est exprimée tout le long de l'axe tonotopique de la cochlée alors que l'expression de *Gai2* est limitée à l'apex.

A ce jour, l'origine de cette différence du profil d'expression de ces protéines le long de l'axe tonotopique reste inconnue. Cependant, il pourrait être envisagé que ce phénomène soit causé par le fait que l'apex et la base de la cochlée ne soient pas apparus au même moment au cours de l'évolution. En effet, l'analyse de fossiles révèle qu'initialement les primates présentaient une cochlée courte avec une grande résolution pour les hautes fréquences (base de la cochlée) et une faible sensibilité aux basses fréquences (apex de la cochlée). Puis, progressivement, au cours de l'évolution un allongement de la cochlée s'est opéré, aboutissant à la formation d'un organe tonotopique. Afin de minimiser au mieux cet encombrement, la cochlée a été contrainte de s'enrouler sur elle-même au sein du crâne (Coleman and Boyer, 2012). Cette modification morphologique a conduit à une augmentation de la sensibilité aux basses fréquences, correspondant à une extension du domaine apical. Aux vues de ces informations, on peut donc émettre l'hypothèse qu'une nouvelle isoforme de *Gai3* soit apparue au cours de l'évolution dans la partie apicale du canal cochléaire. Cette nouvelle isoforme, étant *Gai2*, aurait donc une fonction redondante de *Gai3* dans cette région. L'expression de *Gai3* le long de l'axe tonotopique suggérerait donc qu'elle est l'isoforme "ancestrale".

Nos études comportementales effectuées sur nos souris *Gpsm2^{Foxg1}* mettent en évidence un comportement hyperactif ainsi qu'un défaut d'orientation dans l'espace (déplacement en cercle). Ce comportement est lié à des défauts du système vestibulaire, l'organe de l'équilibre, et plus particulièrement aux stéréocils anormalement courts des CC vestibulaires (Mauriac et al., 2017; Tarchini et al., 2016). De façon surprenante, ce phénotype vestibulaire n'a pas été mentionné dans les différents cas cliniques des patients atteints du CMCS. On pourrait envisager que ce défaut, bilatéral, conduirait à la mise en place de mécanismes de compensation très précoces chez ces patients. Au cours du développement de l'enfant, l'étroite collaboration entre (1) le système vestibulaire, (2) le système visuel, et (3) le système sensoriel (proprioception) va permettre l'acquisition à la fois de la stabilisation du regard au cours des déplacements de la tête et à la stabilisation du tronc dans des conditions dynamiques et statiques. De nombreuses études ont démontré que l'altération du système vestibulaire dès la naissance était à l'origine d'un retard d'acquisition du contrôle postural du corps et par conséquent un retard de la marche. Cependant, chez ces enfants le développement accru du système visuel et du système proprioceptif permet

une compensation de la défaillance du système vestibulaire, permettant d'avoir une vie normale. On peut envisager que les problèmes vestibulaires chez les patients porteurs du CMCS n'ont pas pu être décelés à cause de cette compensation. Afin de valider que ce phénotype est aussi présent chez l'homme, il est prévu que le Pr Friedman, avec qui nous sommes en collaboration, réalise des tests vestibulaires directement chez ces patients. Il existe différents tests permettant de valider un déficit vestibulaire, le plus courant est le test de secouement de la tête. Dans ce cas, les patients portent des lunettes opaques afin de les immerger dans l'obscurité et d'éviter une compensation visuelle pendant le test. Ces lunettes sont reliées à une caméra infrarouge permettant d'enregistrer le réflexe oculaire. Dans ce test, la tête du patient est tournée pendant plusieurs secondes de droite à gauche. Après l'arrêt du mouvement, le réflexe oculaire est enregistré. Chez un patient sans déficit aucun mouvement oculaire ne doit être détecté. En revanche, un patient avec un déficit vestibulaire montrera une oscillation non contrôlée de l'œil, témoignant d'une lésion vestibulaire.

Au cours de notre étude, nous avons constaté que l'accumulation de Gpsm2 et Gai3 semblait être restreinte au sommet des stéréocils les plus longs (rangée 1). Toutefois, cette absence de marquage dans les autres rangées de la touffe ciliaire n'exclut pas que ces protéines puissent y être exprimées en moindre quantité, difficilement détectables. Récemment, le Dr Tadenev a suggéré l'absence d'expression de Gpsm2, Gai3 et Whirlin au sommet des moyennes et petites rangées de stéréocils (rangée 2 et 3). Il va plus loin dans son analyse en affirmant que la présence restrictive de ces protéines au sommet des stéréocils de la première rangée permet de déterminer l'identité de cette rangée et de permettre l'organisation des stéréocils en tailles croissantes. Il base cette affirmation sur le fait qu'en l'absence de Gpsm2 et Gai3, la présence des protéines du complexe Myo15 n'est pas suffisante pour permettre une élongation correcte des stéréocils. Il observe qu'en l'absence de Gpsm2 et Gai3, les protéines du complexe Myo15, sont accumulées de façon homogène et avec une intensité plus faible au sommet de tous les stéréocils, contrairement à une condition contrôle où elles sont préférentiellement accumulées au sommet des stéréocils de la plus grande rangée. Nos immunomarquages de la Myo15 sont en accord avec cette observation. Cependant, contrairement au Dr Tadenev nous observons une diminution de l'intensité de la Whirlin en absence de Gpsm2 et Gai3. On peut penser que cette différence peut être due au fait que nous avons utilisé des anticorps ne reconnaissant pas la même région de la Whirlin et donc ne reconnaissant pas les mêmes isoformes de cette protéine. En effet, dans notre étude, l'anticorps utilisé reconnaît la forme longue de la Whirlin, alors que dans l'étude du Dr Tadenev l'anticorps utilisé permet de reconnaître la forme courte de cette protéine. En se basant sur le fait que ces deux isoformes sont exprimées au sommet des stéréocils, on peut donc penser

que la mutation de *Gpsm2* impacte différemment ces deux isoformes. Cette diminution de l'intensité de fluorescence des protéines du complexe Myo15 observée en absence de *Gpsm2* et *Gai3* suggère un effet sur le transport ou le maintien des protéines du complexe Myo15 au sommet des stéréocils par les protéines *Gpsm2* et *Gai3*. La fonction stabilisatrice de *Gpsm2* sur la Whirlin, que nous avons découvert *in vitro*, renforce cette idée. De façon intéressante, nous avons observé une interdépendance entre les protéines *Gpsm2*, *Gai3* et Whirlin *in vitro* mais aussi *in vivo*. En effet, nous avons observé que l'absence de *Gpsm2* ou *Gai3* ne permettait pas la localisation de la Whirlin au sommet des stéréocils et *vice versa*. Ces données suggèrent donc la présence d'un macrocomplexe composé des protéines Myo15, Whirlin, Eps8, *Gpsm2* et *Gai3* au sommet des stéréocils, nécessaire à l'élongation de cette structure. Cette hypothèse semble d'autant plus plausible que l'absence de chacune de ces protéines conduit à un phénotype similaire avec des stéréocils plus courts, plus épais et une perte de leur organisation en tailles croissances. Au cours de ses travaux, le Dr Tadenev démontre également un gradient de l'intensité de fluorescence de la Myo15 entre ces différentes rangées, avec une plus forte expression de cette protéine dans la rangée la plus longue de stéréocils. Sachant que la quantité de Myo15 au sommet des stéréocils est proportionnelle à la longueur de cette structure (Rzadzinska et al., 2004a), on peut penser que la perturbation de ce gradient d'intensité de Myo15 est directement en lien avec la perturbation de la taille des stéréocils en absence de *Gpsm2* et *Gai3*. Au vu de nos résultats, cette répartition ferait intervenir le complexe *Gpsm2/Gai3* qui permettrait un recrutement/maintien de la Myo15 de façon plus importante dans les stéréocils de la première rangée. Par conséquent, en l'absence de *Gpsm2* et *Gai3*, le recrutement/maintien des protéines du complexe de la Myo15 serait perturbé ce qui conduirait à une répartition homogène de ces protéines et donc à des tailles équivalentes de stéréocils.

Le Dr Tadenev suggère l'existence de deux complexes distincts : le complexe Myo15/Eps8/Whirlin/*Gpsm2/Gai3* au sommet des stéréocils les plus longs et le complexe Myo15/Eps8 au sommet des moyennes et petites rangées de stéréocils. Cette organisation serait essentielle à l'obtention de stéréocils de taille croissante. A ce jour, les mécanismes permettant l'expression des protéines *Gpsm2* et *Gai3* uniquement au niveau des stéréocils les plus longs sont inconnus. Cependant, on peut penser que l'accumulation asymétrique de *Gpsm2/Gai3* en position distale au pôle apical de la CC, derrière la première rangée de stéréocils, joue un rôle déterminant pour que ces protéines soient exclusivement exprimées dans cette première rangée. Pour cela, on peut penser que les protéines Insc, Par6 et aPKC interviennent dans cette fonction. En effet, le Dr Tarchini suggère que la protéine Insc et le complexe de protéines Par6/aPKC

s'excluent à la surface apicale de la CC, permettant d'en définir les domaines proximal (localisation de Par6/aPKC) et distal (localisation de Insc/Gpsm2/G α i3) (Tarchini et al., 2013a). Il suggère que l'absence de Insc conduit à la perte de la localisation de Gpsm2 à la surface apicale de la CC en faveur d'une re-localisation de cette protéine au sommet des stéréocils. De plus, en absence de Insc une expansion de l'expression de Par6/aPKC est observée. On peut donc penser que la protéine Insc a une fonction de stabilisation et de maintien de l'expression asymétrique de Gpsm2 et G α i3 à la surface apicale de la CC, alors qu'à l'inverse les protéines Par6 et aPKC favoriseraient l'expression de Gpsm2 au sommet des stéréocils.

2. Découverte d'une nouvelle fonction et d'un nouveau partenaire pour Gpsm2 : La Whirlin

Par immunoprécipitation, nous avons découvert l'existence d'un nouvel interacteur pour Gpsm2 : la Whirlin. Cette interaction a été récemment validée par le Dr Tadenev (Tadenev et al., 2019a). Plus précisément, grâce à des GST-Pull-down, nous avons démontré une interaction entre le domaine N-terminal de Gpsm2 et le domaine C-terminal de la Whirlin. Nous avons été plus loin dans notre analyse en démontrant que Gpsm2 stabilise l'expression de la Whirlin *in vitro*. Nous avons également observé une interaction entre G α i3 et Whirlin (*annexe – figure 34*). Cette interaction a récemment été validée par le Dr Tadenev (Tadenev et al., 2019) ce qui suggère que Gpsm2 et G α i3 pourraient toutes les deux avoir la capacité de lier la Whirlin.

Bien que la présence (ou l'absence) de Gpsm2 et G α i3 module le ratio d'actine-F/actine-G dans des cellules HEK293T et des neurones en culture, nos résultats ne démontrent pas un rôle direct de Gpsm2 sur la polymérisation d'actine. Dans le but de valider une éventuelle fonction directe de G α i3 sur la polymérisation d'actine nous avons utilisé un kit permettant de mesurer la cinétique de polymérisation d'actine en temps réel en présence de protéine G α i3 purifiée (cytoskeleton – kit BK003). Malheureusement, le tampon permettant de purifier et de maintenir la conformation GDP de G α i3 (forme liée à Gpsm2) avait un effet nucléateur propre nous empêchant de conclure sur un effet de cette protéine seule. Nous avons également testé en collaboration avec le Dr J. Bird un effet direct de G α i3 sur la vitesse de déplacement de la Myo15 sur des filaments d'actine *in silico*, là aussi sans succès.

En parallèle, nous avons cherché à déterminer si les formes tronquées de Gpsm2 pouvaient impacter différemment le taux de polymérisation d'actine et avoir un effet dominant négatif. Pour cela, nous avons utilisé des cellules hétérologues (COS-7) qui génèrent de nombreux et longs filopodes lors d'une co-transfection avec la Myo15 et la Whirlin. Dans notre condition contrôle, les

cellules exprimaient la Myo15 et la Whirlin, alors que dans notre condition test elles exprimaient la Myo15 et la Whirlin en présence de Gpsm2 ou de formes tronquées de Gpsm2. En mesurant la longueur des divers filopodes, qui est proportionnelle à la dynamique de polymérisation/dépolymérisation d'actine, nous avons remarqué que l'expression de la forme entière de Gpsm2 augmente significativement la longueur des filopodes, alors qu'à l'inverse les formes tronquées diminuent de façon significative cette longueur. En fait, les filopodes générés avec une forme tronquée de Gpsm2 étaient en moyenne plus courts que ceux générés par la présence de Myo15 et Whirlin seules, suggérant un effet dominant-négatif des formes tronquées de Gpsm2. L'ensemble de ces formes possède toujours l'expression de leur domaine N-terminal (domaines TPR). On peut donc penser que ces constructions maintiennent leurs interactions en N-terminal mais bloquent des voies de signalisation auxquelles elles participaient en ne liant plus leurs partenaires protéiques en C-terminal.

Cette fonction du complexe Gpsm2/Gai3 sur la modulation du cytosquelette d'actine pourrait expliquer la présence des stéréocils anormalement courts et par conséquent les surdités retrouvées chez les patients atteints du CMCS. De plus, cette variabilité de phénotypes observée *in vitro* induite par les différentes formes tronquées de Gpsm2 pourrait être à l'origine de la variabilité de phénotypes retrouvés chez les patients porteurs du CMCS.

3. Gpsm2 : une protéine nécessaire à la fonction synaptique de la CC et au développement du ganglion spiral

Bien que l'altération de la longueur des stéréocils lors de la mutation de *Gpsm2*, *Gnai3* et *Gnai2/3* semble être la cause majeure des surdités retrouvées chez ces mutants murins, on peut également envisager que d'autres anomalies de la CC pourraient participer à ces surdités.

A l'aide d'images obtenues en microscopie électronique à balayage, nous avons mis en évidence que les tip-links entre les stéréocils sont toujours présents chez les mutants *Gpsm2*^{Foxg1} et *Gnai3*^{Foxg1}. Cette observation suggère donc que les canaux de mécanotransduction ont toujours la possibilité d'être ouverts. A l'aide du colorant FMI-43 perméable aux canaux de mécanotransduction, le Dr Tarchini a démontré que sur un modèle murin muté pour *Gpsm2* (*LGN*^{BF}), et un modèle murin inactivé pour la voie de signalisation des protéines Gai (souris *PTXa*), les canaux de mécanotransduction sont fonctionnels (Tarchini et al., 2016). Cependant, en analysant leurs résultats on peut observer que l'intensité de FMI-43 est visiblement diminuée chez ces mutants par comparaison aux souris contrôles. On peut supposer que cette diminution de l'intensité de fluorescence soit en lien avec une diminution de la fonctionnalité de ces canaux

induite par des stéréocils plus courts ainsi que par la perte de l'organisation en taille croissante des stéréocils. Cette altération de l'architecture de la touffe ciliaire conduirait à une diminution de la tension exercée par les tip-links et par conséquent à une diminution de la probabilité d'ouverture des canaux de mécanotransduction. Ce phénotype pourrait donc potentialiser les surdités retrouvées chez nos modèles murins.

On peut aussi envisager qu'une atteinte synaptique à la base des CCI pourrait participer à ces surdités. En se basant sur des immunomarquages des canaux SK2 (CC immature) et BK (CC mature), le Dr Rüttiger a démontré que la mutation de *Gnai3* ou *Gnai2* n'affecte pas la maturité synaptique alors que la mutation simultanée de ces deux gènes conduit à des synapses immatures (Beer-Hammer et al., 2018). Récemment, par l'utilisation des mêmes marqueurs et par une analyse morphologique à la base de la CCI, cette immaturité a aussi été observée par le Dr Jean dans les souris *LGN^{BF}* et *PTXa* (Jean et al., 2019). De plus, il démontre que les protéines $G\alpha i$ et *Gpsm2* sont essentielles à la mise en place du gradient de taille des synapses à ruban à la base des CCI. En effet, contrairement à une condition contrôle où un gradient de la taille des synapses à ruban est observé avec des synapses plus volumineuses du côté proximal (modiolar) et des synapses plus petites du côté distal (pillar) (Coate and Kelley, 2013; Liberman et al., 2011), l'inactivation des protéines $G\alpha i$ (souris *PTXa*), l'absence de $G\alpha i3$ (*Gnai3 KO*) et *Gpsm2* (*LGN^{BF}*) conduisent à une taille identique de ces synapses le long de cet axe (Jean et al., 2019). Cependant, il observe grâce à un immunomarquage des protéines RIBEYE/CtBP2 que le nombre de synapses à ruban ne semble pas être affecté lors de l'inactivation des protéines $G\alpha i$ (souris *PTXa*). Cependant, cette information n'est pas indiquée pour les souris *LGN^{BF}* et il serait intéressant de le déterminer. Au niveau fonctionnel, il observe une augmentation du courant calcique en lien avec une augmentation du nombre de canaux $Ca_v1.3$ à la base de la CCI. L'ensemble de ces résultats est en faveur d'une immaturité de la CCI. En plus de l'altération morphologique de la touffe ciliaire à l'apex de la CC, cette altération synaptique à la base de la CCI pourrait donc participer aux surdités chez ces modèles murins. En accord avec leurs interprétations, on peut conclure que les protéines $G\alpha i$ et *Gpsm2*, participent à un complexe moléculaire à la base de la CCI nécessaire à la maturation de celle-ci.

A ce jour, on ne connaît pas de base moléculaire en lien avec le complexe *Gpsm2/G\alpha i3* fonctionnant à la base de la CCI. Cependant, on peut envisager que le macrocomplexe formé par les protéines des complexes *Gpsm2/G\alpha i3* et la Whirlin au sommet des stéréocils soit aussi présent à la base de la CCI. Si nous prenons l'exemple des photorécepteurs de la rétine qui est un système très proche des CC de la cochlée, la Whirlin interagit et participe à la distribution des

canaux $Ca_v1.3$ (Kersten et al., 2010 ; Zou et al., 2012). Par extrapolation, sachant que ces mêmes canaux sont affectés en l'absence de *Gpsm2* et *Gai3*, on peut penser que la *Whirlin* pourrait former un macrocomplexe avec ces protéines ce qui pourrait expliquer que le nombre de canaux $Ca_v1.3$ soit affecté à la base de la CCI.

Peu de choses sont encore connues sur la fonction de *Gai3* et de *Gpsm2* en post-synaptique. Toutefois, le mutant *PTXa* semble présenter des densités post-synaptiques (PSD95) plus larges et plus complexes en lien avec la perturbation de la répartition des canaux $Ca_v1.3$ au niveau pré-synaptique (Jean et al., 2019). De plus, le Dr Rüttiger met en évidence l'expression de *Gai3* également au niveau du ganglion spiral, et observe en l'absence de cette protéine une diminution de l'expression des récepteurs vGLUT1 (vesicular glutamate transporter 1) en lien avec une réduction de l'excitabilité de ce neurone (Beer-Hammer et al., 2018). Ces résultats suggèrent donc aussi un rôle des protéines *Gai* en post-synaptique.

4. Perspectives thérapeutiques

Dans un but thérapeutique, il serait intéressant de tester chez nos souris mutées pour *Gpsm2* si une restauration auditive est possible par injection de virus intra-cochléaire. Cette technique consiste en l'injection d'un virus codant pour nos protéines d'intérêt directement dans l'oreille interne entre P0 et P3. Parmi les virus, de nombreux sérotypes de virus AAV ont été testés et à l'heure actuelle, le sérotype ANC80L65 semble être le plus efficace avec près de 90% de CCI et CCE infectées ainsi que près de 40% des cellules du ganglion spiral (Ahmed et al., 2017; Suzuki et al., 2017). Si on prend l'hypothèse que la surdité chez nos souris *Gpsm2^{Foxg1}* est majoritairement due à la présence de stéréocils anormalement courts, notre but serait de restaurer la longueur des stéréocils en surexprimant la forme sauvage de cette protéine. Cette situation a déjà été décrite pour le mutant *Whirler* (muté pour la *Whirlin*) qui présente des stéréocils anormalement courts tout comme lors de l'absence de *Gpsm2*. Ce modèle murin est connu pour avoir une surdité sévère et précoce ainsi que des problèmes vestibulaires. Dans le but d'une restauration auditive et vestibulaire, le Dr Isgrig a injecté par les canaux semi-circulaires un virus AAV (sérotype 2/8) codant pour la *Whirlin*. Par cette technique, il obtient une infection minimum de 70% des CC. Il observe une restauration totale de la longueur des stéréocils des CC infectées, aussi bien dans la cochlée que dans le vestibule. Cette restauration permet une restauration totale de la fonction vestibulaire chez ces souris injectées. Cependant, seulement une restauration partielle de l'audition est obtenue chez les souris injectées. Il émet l'hypothèse qu'une restauration totale de l'audition serait possible avec une infection plus importante des CC. En se basant sur ces études,

on peut supposer que l'injection à P0/3 chez les souris *Gpsm2*^{Foxg1} d'un virus codant pour la forme entière de *Gpsm2* avec un sérotype ANC80L65, pour avoir une meilleure infection, permettrait une restauration de la longueur des stéréocils et donc au minimum une restauration partielle de la fonction auditive.

Comme discuté précédemment, en plus d'affecter l'élongation et la morphologie de la touffe ciliaire à l'apex de la CC, la mutation de *Gpsm2* ou *Gnai* sont aussi en lien avec une altération synaptique à la base de la CCI. Les travaux du Dr Dulon en 2018 démontrent que la *Clarín-1* est essentielle à la fois à l'apex de la CCI, pour la morphologie et la maintenance de la touffe ciliaire, mais aussi à la base de la CCI au cours du développement des synapses à ruban. Dans ces travaux, il démontre que l'injection intra-cochléaire par la fenêtre ronde entre P1 et P3 d'un virus (sérotype AAV2/8) codant pour la *Clarín-1* chez des souris mutées pour la *Clarín-1* permet une amélioration de la fonction auditive en limitant les défauts morphologiques de la touffe ciliaire ainsi que les défauts synaptiques (Dulon et al., 2018). Au vu de ces résultats, on peut penser que l'injection virale intracochléaire reste une excellente technique pour une restauration de la fonction auditive chez les souris *Gpsm2*^{Foxg1} par restauration de la longueur des stéréocils mais aussi en limitant les défauts synaptiques.

Cependant, on sait que la mise en place de la touffe ciliaire ainsi que les connections synaptiques sont déjà établies à la naissance chez la souris et se développent pendant les deux premières semaines post-natales. On peut donc penser qu'une injection virale post-natale ne permette pas une restauration totale du phénotype car les défauts induits par l'absence de cette protéine seraient déjà établis. Dans le cas où aucune amélioration du phénotype n'est observée lors d'une injection virale post-natale, on peut penser que cette injection est trop tardive pour avoir une restauration totale du phénotype. Il serait donc intéressant de tester si une infection virale *in utero* aurait la capacité d'induire une meilleure restauration du phénotype (Bedrosian et al., 2006; Wang et al., 2012b).

Bien que les deux techniques d'infection (*in utero* et post-natale) soient réalisées chez la souris, il est encore difficile d'envisager cette technique chez l'homme. L'une des grandes difficultés pour traiter cet organe est son accessibilité. Toutefois, bien que ce soit aussi un obstacle pour l'œil, de nombreux essais cliniques utilisant des AAV ont débuté chez l'homme (Trapani and Auricchio, 2018). Ces données laissent donc de l'espoir pour voir un jour une régénération de l'audition par injection virale.

B. Gpsm2 : une protéine importante dans la maturation du système nerveux central

1. Gpsm2 affecte la neurogénèse et la motilité neuronale

Gpsm2 est enrichie dans la zone de génération des progéniteurs neuronaux (VZ) et est connue pour son rôle au cours de la neurogénèse (Konno et al., 2008). L'absence de Gpsm2 conduit à une perturbation de l'orientation du fuseau mitotique de division des progéniteurs neuronaux engendrant une différenciation précoce et un épuisement prématuré des progéniteurs apicaux. Aucune anomalie morphologique du cortex n'avait été observée chez ce mutant par le Dr Konno (Konno et al., 2008). Notre propre analyse morphologique du cerveau des souris *Gpsm2^{Emx1}* révèle une hypoplasie du corps calleux, un des phénotypes systématiquement retrouvés chez les patients atteints du CMCS. Cette malformation peut avoir au moins deux origines : (1) une perturbation du nombre de progéniteurs neuronaux et/ou (2) un défaut de l'élongation et du guidage axonal qui sont tous les deux des mécanismes dépendants du cytosquelette d'actine et de tubuline. La projection des axones commissuraux sur l'hémisphère controlatéral est possible grâce au déplacement du cône de croissance riche en actine. Nous avons donc dans un premier temps analysé l'impact de la mutation de *Gpsm2* sur la motilité du cône de croissance. Notre analyse *in vitro* révèle une diminution de la vitesse ainsi qu'une augmentation du nombre de pauses du cône de croissance. Ce phénotype ne semble pas être dépendant du substrat sur lequel ces neurones sont cultivés. Par conséquent, les molécules d'adhésions ne semblent pas participer au ralentissement du cône de croissance, qui serait dû à un phénomène intrinsèque au neurone. Ce phénotype pourrait être expliqué par le fait que la mutation de *Gpsm2* conduit à une perturbation de la dynamique d'actine au sein de cette structure. Ces anomalies seraient à l'origine de la réduction de la motilité du cône de croissance et donc à l'origine de l'hypoplasie du corps calleux chez ce modèle murin mais aussi chez les patients atteints du CMCS.

De façon originale, nos travaux mettent donc en avant une base moléculaire commune, composée des protéines du complexe Gpsm2/G α i3, expliquant à la fois les surdités et l'hypoplasie du corps calleux. Comme le complexe Gpsm2/G α i3 participe aussi à la modulation du cytosquelette d'actine dans les neurones, nous pouvons penser que ces protéines participent au même macrocomplexe présent au sommet des stéréocils avec les protéines du complexe de la Myo15. En se basant sur des immunoprécipitations faites à partir de lysat hippocampique et montrant une interaction entre Gpsm2 et la Whirlin, on peut penser que la Whirlin participe aussi à ce mécanisme. Dans les neurones hippocampiques, la Myo10, homologue de la Myo15, joue

un rôle essentiel dans le développement neuronal en régulant des facteurs essentiels au remodelage de l'actine (Lin et al., 2013). On peut donc penser que la Myo10 aussi puisse former un complexe avec Gpsm2, G α 3 et la Whirlin dans les neurones. Toutefois, nous avons découvert par western blot sur tissu hippocampique frais que la Myo15 était aussi exprimée au niveau cérébral (donnée non montrée). On peut donc penser que le complexe Gpsm2/G α 3 peut également interagir avec le complexe de la Myo15 au niveau cérébral. Ce macrocomplexe pourrait alors jouer sa fonction sur la modulation de la dynamique du cytosquelette d'actine dans cette structure de façon similaire aux stéréocils.

Bien que nous ayons une base moléculaire pour les hypoplasies du corps calleux, nous restons sans réponse pour l'origine d'autres anomalies cérébrales présentes chez les patients atteints du CMCS. Dans le cas des hétérotopies ou des polymicrogyries l'origine peut être commune et peut être expliquée par une perturbation de la neurogénèse, de la migration neuronale ou de ces deux paramètres combinés (Buchsbaum and Cappello, 2019b). Pour déterminer si Gpsm2 joue aussi un rôle au cours de la migration neuronale, nous avons choisi d'utiliser la technique de l'électroporation *in utero*. A long terme, grâce à cette technique, notre objectif sera d'analyser l'influence de la surexpression de Gpsm2 (Gpsm2^{FL}) et d'une forme tronquée de cette protéine (Gpsm2^{R318X}), qui correspond à une des formes engendrant les anomalies cérébrales les plus sévères, sur la migration neuronale chez les patients atteints du CMCS (*tableau 2*). Sachant que la migration neuronale est un mécanisme dépendant du cytosquelette d'actine et de tubuline et que Gpsm2 influence ces paramètres, nous nous attendons à ce que la surexpression de Gpsm2^{FL} ou Gpsm2^{R318X} perturbe la migration neuronale au niveau cortical. Après avoir mis au point cette technique, notre première expérience (n=1) suggère que Gpsm2^{FL} favoriserait la migration neuronale (*annexe – figure 35*). Cependant, avec une seule expérience il n'est pas possible de conclure sur ce résultat. Dans la continuité de ce projet, cette expérience sera répétée et des électroporations avec une forme tronquée de Gpsm2^{R318X} seront aussi réalisées. Si notre hypothèse est validée, ces résultats originaux nous permettraient de mettre en évidence une nouvelle fonction de Gpsm2 dans la migration neuronale pouvant expliquer les hétérotopies ou les polymicrogyries retrouvées chez les patients atteints du CMCS.

2. Gpsm2 et troubles cognitifs

Si on analyse de plus près les différents cas cliniques décrivant les phénotypes des patients atteints du CMCS, on constate en plus des surdités et des anomalies cérébrales un panel de

troubles cognitifs (*tableau 2*). Un trouble cognitif est défini comme un trouble mental qui altère la mémoire, la perception et la réflexion. On peut donc émettre l'hypothèse que les différentes mutations de *Gpsm2* retrouvées chez les patients atteints du CMCS affectent différemment le développement cérébral à l'origine des troubles cognitifs variables retrouvés chez ces patients. Afin de déterminer la présence de troubles cognitifs chez les souris *Gpsm2^{Emx1}* des tests comportementaux sont à prévoir. Nos données préliminaires suggèrent un problème de sociabilité chez les souris *Gpsm2^{Emx1}* (*annexe figure 36*). Cependant, afin de conclure sur ces phénotypes, des expériences complémentaires sont prévues dans la suite de ce projet.

Il est à noter qu'une étude de 2005 a démontré un rôle de *Gpsm2* sur la régulation du nombre de récepteurs NMDA (NMDAR) à la synapse. En particulier, l'absence de *Gpsm2* réduit le nombre de NMDAR dans l'épine dendritique des neurones hippocampiques en culture (Sans et al., 2005). Le mécanisme moléculaire avancé à l'époque était une interaction directe de SAP102 (Dlg3) avec *Gpsm2* (mPins) qui participe au ciblage des NMDAR à la synapse. Il est intéressant de noter que le Dr Gegg a observé une distribution asymétrique en croissant et distale de Dlg3-Venus, dans la même région que *Gpsm2* (Gegg et al., 2014). Ce qui suggère que l'interaction *Gpsm2*-Dlg3 est un membre du complexe protéique modulant la polarité/morphogénèse des CC.

C. Le complexe Crumbs et le système auditif

1. Un complexe Crumbs3/Pals1/Mpdz à la surface apicale de la CC ?

Nos résultats mettent en évidence qu'à la naissance la protéine Crumbs3 est exprimée de façon homogène à la surface apicale de la CC. L'analyse à la naissance de l'épithélium auditif des quelques souris mutées pour *Crumbs3* (*Crumbs3 KO*), obtenues *via* le Dr Margolis (Université du Michigan, USA), met en évidence des anomalies structurelles de l'épithélium caractérisées par des défauts morphologiques et de cohésion des touffes ciliaires, similaires à la mutation de *Gpsm2* et *Gnai3*. De plus, chez ces souris transgéniques, le profil d'expression de *Gai3* à la surface apicale est perturbé.

L'interacteur classique de Crumbs3, Pals1, possède le même profil d'expression que *Gpsm2/Gai3*, un profil en croissant asymétrique et distal. Nous avons confirmé une co-localisation entre Pals1 et *Gai3* ainsi qu'avec *Gpsm2* dans les CC (donnée non montrée). Cette localisation asymétrique originale de Pals1 ne corrèle pas avec l'expression d'un de ses interacteurs classiques, Patj. Celui-ci semble en effet présent à la surface apicale des CS et à leurs jonctions. Nous ne pouvons pas pour le moment exclure sa présence à la jonction des CC. Ce résultat

original suggère que les CS possèdent un complexe moléculaire différent des CC, que nous souhaitons analyser dans le futur. En revanche, Mpdz/Mupp1, un homologue de Patj chez les mammifères, est enrichie dans les CC. Plus précisément, cette protéine est exprimée de façon asymétrique au pôle distal à la surface apicale des CC de façon similaire aux protéines du complexe Gpsm2/Gai3, mais elle est aussi exprimée au niveau des jonctions cellules-cellules. Nous observons également un marquage plus faible au niveau proximal à la surface apicale de la CC, qui ressemble à celui de Par6/aPKC (Ezan et al., 2013).

Nos résultats préliminaires suggèrent que Mpdz est à la surface des CC et pas des CS, et que Patj est à la surface des CS mais pas des CC. Pour le moment, il nous est impossible de conclure quant à la présence des deux protéines aux TJ. A savoir : est-ce que Patj est présent uniquement aux TJ des CS et Mpdz uniquement aux TJ des CC, ou aux deux.

Nous devons encore évaluer le profil d'expression spatio-temporel de Mpdz et des protéines du complexe Crumbs. Cette analyse nous permettra d'identifier quelle protéine est exprimée en premier de façon asymétrique dans ce système. En effet, nous savons déjà que Gai3 est exprimée dès E15,5 à la surface apicale des CC (Ezan et al., 2013). Cependant nous n'avons aucune donnée pour les protéines du complexe Crumbs. Dans ce but, nous souhaitons réaliser des immunomarquages de ces protéines dès E14,5.

2. La mutation de *Mpdz/Mupp1* semble affecter la maturation des CC et leur fonction

L'analyse morphologique de l'épithélium auditif des souris mutées pour *Mpdz* (*Mpdz^{Foxg1}*) révèle un phénotype assez similaire à la mutation de gènes codant pour des protéines apicales des CC (Gpsm2, Gai et Daple), avec des touffes ciliaires malformées, souvent aplaties et parfois fractionnées. Nos premières analyses immunocytochimiques suggèrent une réduction de l'intensité de fluorescence de Gpsm2 et Gai3 à la surface apicale des CC dans les mutants *Mpdz^{Foxg1}*. De façon surprenante, nous avons aussi observé (par deux fois) que l'absence de Mpdz engendre une perte d'expression de Pals1 à la surface apicale de la CC. Cette donnée suggère que Mpdz est essentielle à la localisation apicale de Pals1. Un résultat proche avait été obtenu sur des cellules Caco2 (cellules qui forment des TJ *in vitro*) par le groupe d'André Le Bivic en 2005 (Michel et al., 2005). Ils démontrent en particulier que dans ces cellules où l'expression de Patj est réduite (siRNA), Pals1 n'est plus associée aux TJ, suggérant que dans ce système Patj régule le complexe Crumbs. Le même groupe confirme que dans des cellules MCF10A (cellules épithéliales mammaires humaines normales qui ne forment pas de TJ *in vitro*) un siRNA-Patj affecte le taux de Pals1. Par contre, la même étude montre qu'un siRNA-Mpdz ne l'affecte

pas. Il y a donc des différences fonctionnelles entre Patj et Mupp1, qui semblent dépendre du contexte. Ainsi, les cellules MCF10A expriment à la fois Patj et Mpdz à leurs jonctions, permettant une compensation protéique entre ces protéines dans ces cellules. Plus récemment, une étude *in vivo* faite par le Dr Feldner en 2017 (notre collaborateur sur ce projet), montre une diminution importante de l'expression de Pals1 au niveau des cellules épendymaires des souris mutées pour *Mpdz* (*Mpdz*^{-/-}). Etant donné le parallèle moléculaire entre les cellules épendymaires et les CC, ce résultat est particulièrement intéressant et soutient nos propres résultats préliminaires (Feldner et al., 2017b).

Nous avons identifié une interaction entre Pals1 et Gpsm2 dans des cellules hétérologues (HEK293T) en surexpression. L'absence d'expression de Pals1 chez les mutants *Mpdz*^{Foxg1} ainsi que cette nouvelle interaction pourraient expliquer la diminution de recrutement de Gpsm2 et Gai3 à la surface apicale de la CC.

L'analyse préliminaire de deux animaux *Mpdz*^{Foxg1} de la même portée à P11 suggère que *Mpdz* n'est pas présente au sommet des stéréocils à ce stade plus tardif. En revanche, *Mpdz* continue à être exprimée de façon asymétrique à la surface apicale de la CC. Cette absence de *Mpdz* au sommet des stéréocils – à confirmer - suggère que cette protéine n'est pas impliquée dans leur élongation. L'analyse en microscopie confocale de la longueur des stéréocils entre une souris contrôle et une souris *Mpdz*^{Foxg1} ne montre pas de différence à P11 (n=1). Chez les mêmes animaux, nous avons également observé que Gpsm2 est toujours exprimée au sommet de stéréocils à P11 en absence de *Mpdz*.

Afin de valider un déficit fonctionnel chez les souris *Mpdz*^{Foxg1}, des tests auditifs ont été réalisés à deux stades de développement : P21 et P50 (collaboration avec le groupe du Dr Dulon). Grâce à ces tests nous avons découvert que *Mpdz* est essentiel à la fonction auditive. En particulier, nous observons une réduction du seuil auditif pour toutes les fréquences. De plus, ces souris perdent aussi la fonction des CCE sur l'amplification des ondes sonores comme l'indiquent les mesures des DPOAes. Cependant, contrairement à la mutation de *Gpsm2*, celle de *Mpdz* ne conduit pas à une surdité précoce mais progressive avec une élévation du seuil auditif plus important à P50 par rapport à P21. Ces résultats sont cohérents avec deux études récentes suggérant que *Mpdz* serait un nouveau gène de la surdité (Bowl et al., 2017; Shaheen et al., 2017).

Nos résultats préliminaires suggèrent que les déficits structurels apicaux de la CC sont à l'origine des surdités chez les souris *Mpdz*^{Foxg1}. Cependant, l'augmentation de l'amplitude et du

temps de latence de la première onde sur les ABR suggère également un déficit d'origine synaptique. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que le Dr Krapivinsky en 2004 décrit le complexe Mpdz / SynGAP (Synaptic - GTPase Activating Protein) / CamKII (Ca²⁺ Calmodulin dependante Kinase II) comme étant indispensable à la régulation des AMPAR dans les synapses hippocampiques (Krapivinsky et al., 2004). On peut donc penser que ce mécanisme indispensable pour la fonction et l'architecture des synapses hippocampiques soit aussi valable au niveau des synapses à ruban à la base de la CC. En effet, un défaut de régulation des AMPAR à la membrane plasmique des synapses à ruban pourrait expliquer un défaut synaptique et par conséquent participer à une surdité en absence de Mpdz.

D. Rôle de Mpdz au niveau cérébral

La mutation du gène *Mpdz* est à l'origine d'hydrocéphalies congénitales sévères (Al-Dosari et al., 2013; Shaheen et al., 2017). La protéine Mpdz est exprimée dans les cellules épendymaires (Sitek et al., 2003). Le Dr Feldner démontre que l'absence d'expression de cette protéine dans ces cellules perturbe la stabilité de cet épithélium et conduit à une augmentation de la mort de ces cellules, engendrant progressivement une sténose de l'aqueduc de Sylvius (Feldner et al., 2017b). Le liquide céphalorachidien ne pouvant plus s'écouler s'accumule dans les ventricules conduisant à une hydrocéphalie. Chez ces souris, l'hydrocéphalie commence à être visible à partir de P3 et s'aggrave progressivement jusqu'à la mort des animaux vers P21 (Feldner et al., 2017b). Du fait de cette sévérité de phénotype, il est difficile de déterminer si la mutation de ce gène est à l'origine d'autres anomalies cérébrales. Afin de le déterminer, nous avons commencé une analyse structurale du cerveau de souris *Mpdz*^{*Emx1*} qui n'expriment pas ce gène dans les cellules épendymaires. Notre analyse suggère une hypoplasie du corps calleux (n=1). Des analyses complémentaires sont à prévoir afin de valider ce phénotype, et d'autres.

E. Daple : le lien entre Gpsm2 et Mpdz ?

Au vu de nos résultats et de la littérature, un lien entre Mpdz et Gpsm2 semble inévitable. En effet, l'absence de ces protéines sont connues pour : (1) jouer un rôle sur la maturation apicale et basale des CC, (2)  tre indispensable à la fonction auditive et (3) induire des malformations cérébrales (Al-Dosari et al., 2013; Chudley et al., 1997; Krapivinsky et al., 2004; Mauriac et al., 2017; Sans et al., 2005).

Pour le moment, nous n'avons pas mis en évidence d'interaction directe entre ces deux protéines et il est donc possible que les complexes soient liés par une protéine intermédiaire. La

protéine Daple est un bon candidat pour ce lien. Des études récentes suggèrent que *Daple* serait un nouveau gène de la surdité (Bowl et al., 2017; Shaheen et al., 2017). Daple est exprimée de façon asymétrique à la surface apicale de la CC (Siletti et al., 2017) et la mutation de ce gène conduit à une perturbation de l'architecture de l'épithélium auditif avec des touffes ciliaires mal orientées, malformées, non cohésives et aplaties. L'ensemble de ces anomalies est similaire à celles observées lors de la mutation de *Gpsm2* ou *Mpdz*. De plus, Daple (aussi connue sous le nom de HYC1 ou CCDC88c (Coiled-Coil Domain-Containing protein 88c), est à l'origine d'hydrocéphalies chez l'homme, tout comme *Gpsm2* et *Mpdz* (Drielsma et al., 2012; Shaheen et al., 2017; Takagishi et al., 2017). De façon intéressante, une interaction entre Daple et le complexe *Gpsm2*/ α 3 est suggérée par une expérience de double-hybride, mais non confirmée (Siletti et al., 2017). Récemment, une interaction entre Daple et α 3 *in vitro* dans des cellules HEK293T a été démontrée par le Dr Marivin (Marivin et al., 2019). De plus, le Dr Bown suggère que la mutation de *Daple* conduit à un déficit auditif dans les hautes fréquences, de façon similaire à la mutation de *Gnai3* (Bowl et al., 2017; Mauriac et al., 2017). Cette donnée renforce l'idée d'une intéraction entre Daple et α 3 dans les CC, qu'il serait intéressant d'étudier. Nous souhaitons également valider une éventuelle interaction entre Daple et *Gpsm2*, mais aussi tester si une interaction entre *Mpdz* et Daple existe. Par la suite, il serait intéressant d'analyser si l'expression de Daple est perturbée chez les mutants *Gpsm2*^{Foxg1} et *Mpdz*^{Foxg1}. Si ces interactions s'avèrent vraies, cette recherche aboutirait à la découverte d'un nouveau complexe macromoléculaire indispensable à la polarité des CC et à la fonction auditive.

F. Conclusion générale

Notre étude a permis la découverte des bases moléculaires d'une pathologie rare causée par la mutation de *GPSM2* : Le syndrome de Chudley McCullough (CMCS). La complexité et la variabilité des phénotypes décrits chez ces patients pourraient être expliquées par le rôle multifonctionnel du complexe Gpsm2/ $G\alpha i3$. Nous avons identifié une nouvelle fonction de Gpsm2 sur la modulation du cytosquelette d'actine qui serait à l'origine des surdités mais aussi de l'hypoplasie du corps calleux décrites chez ces patients. Dans cette fonction, le complexe Gpsm2/ $G\alpha i3$ forme un macrocomplexe avec les protéines du complexe Myo15 par le biais d'une interaction avec la Whirlin (Mauriac et al., 2017).

De façon originale dans ce système, nos données préliminaires suggèrent un rôle des protéines Crumbs3/Pals1/Mpdz sur la maturité apicale et basale des CC. Dans ce but, ce complexe formerait un macrocomplexe avec les protéines Gpsm2 et $G\alpha i3$ à la surface apicale de la CC. Peu de choses sont encore connues sur ces bases moléculaires, mais au vu des similarités de phénotypes aux niveaux auditif et cérébral, on peut penser que la protéine Daple s'ajouterait à ce complexe (figure 32).

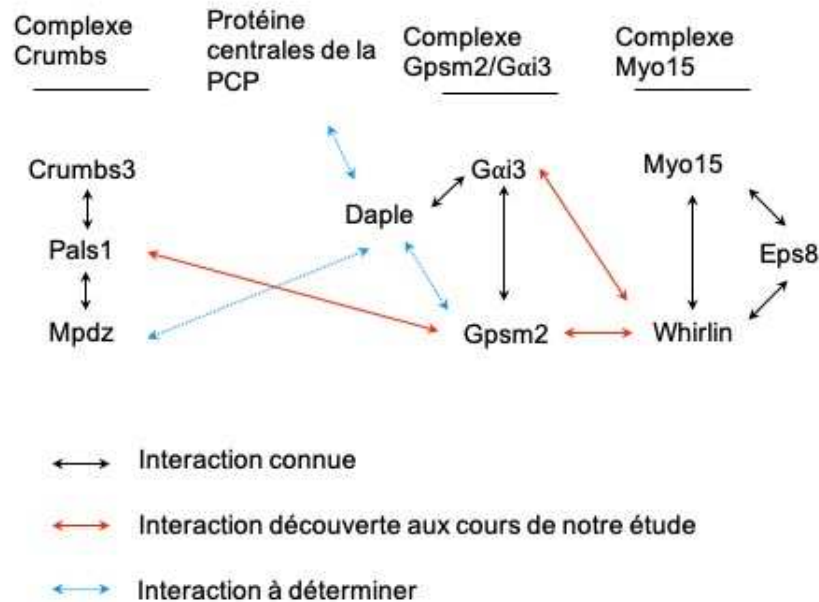


Figure 32 : Représentation schématique des interactions protéiques connues, découvertes et à déterminer à la surface des CC

Références

- Adachi, M., Hamazaki, Y., Kobayashi, Y., Itoh, M., Tsukita, S., Furuse, M., and Tsukita, S. (2009). Similar and Distinct Properties of MUPP1 and Patj, Two Homologous PDZ Domain-Containing Tight-Junction Proteins. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 2372–2389.
- Adler, P.N., and Lee, H. (2001). Frizzled signaling and cell-cell interactions in planar polarity. *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 635–640.
- Adler, P.N., Zhu, C., and Stone, D. (2004). Inturned localizes to the proximal side of wing cells under the instruction of upstream planar polarity proteins. *Curr. Biol. CB* *14*, 2046–2051.
- Ahmed, H., Shubina-Oleinik, O., and Holt, J.R. (2017). Emerging Gene Therapies for Genetic Hearing Loss. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* *18*, 649–670.
- Alazami, A.M., Patel, N., Shamseldin, H.E., Anazi, S., Al-Dosari, M.S., Alzahrani, F., Hijazi, H., Alshammari, M., Aldahmesh, M.A., Salih, M.A., et al. (2015). Accelerating novel candidate gene discovery in neurogenetic disorders via whole-exome sequencing of prescreened multiplex consanguineous families. *Cell Rep.* *10*, 148–161.
- Al-Dosari, M.S., Al-Owain, M., Tulbah, M., Kurdi, W., Adly, N., Al-Hemidan, A., Masoodi, T.A., Albash, B., and Alkuraya, F.S. (2013). Mutation in MPDZ causes severe congenital hydrocephalus. *J. Med. Genet.* *50*, 54–58.
- Al-Jezawi, N.K., Al-Shamsi, A.M., Suleiman, J., Ben-Salem, S., John, A., Vijayan, R., Ali, B.R., and Al-Gazali, L. (2018). Compound heterozygous variants in the multiple PDZ domain protein (MPDZ) cause a case of mild non-progressive communicating hydrocephalus. *BMC Med. Genet.* *19*, 34.
- Antic, D., Stubbs, J.L., Suyama, K., Kintner, C., Scott, M.P., and Axelrod, J.D. (2010). Planar cell polarity enables posterior localization of nodal cilia and left-right axis determination during mouse and *Xenopus* embryogenesis. *PLoS One* *5*, e8999.
- Artegiani, B., Lange, C., and Calegari, F. (2012). Expansion of Embryonic and Adult Neural Stem Cells by In Utero Electroporation or Viral Stereotaxic Injection. *J. Vis. Exp.* 4093.
- Assémat, E., Bazellières, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A., and Massey-Harroche, D. (2008). Polarity complex proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1778*, 614–630.
- Assémat, E., Crost, E., Ponsérre, M., Wijnholds, J., Le Bivic, A., and Massey-Harroche, D. (2013). The multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) expression regulates cellular levels of the PALS-1/PATJ polarity complex. *Exp. Cell Res.* *319*, 2514–2525.
- Atkinson, P.J., Najarro, E.H., Sayyid, Z.N., and Cheng, A.G. (2015). Sensory hair cell development and regeneration: similarities and differences. *Development* *142*, 1561–1571.
- Avenarius, M.R., Krey, J.F., Dumont, R.A., Morgan, C.P., Benson, C.B., Vijayakumar, S., Cunningham, C.L., Scheffer, D.I., Corey, D.P., Müller, U., et al. (2017). Heterodimeric capping protein is required for stereocilia length and width regulation. *J. Cell Biol.* *216*, 3861–3881.
- Aw, S., and Levin, M. (2009). Is left-right asymmetry a form of planar cell polarity? *Development* *136*, 355–366.
- Aznar, N., Midde, K.K., Dunkel, Y., Lopez-Sanchez, I., Pavlova, Y., Marivin, A., Barbazán, J., Murray, F., Nitsche, U., Janssen, K.-P., et al. (2015). Daple is a novel non-receptor GEF required for trimeric G protein activation in Wnt signaling. *ELife* *4*, e07091.
- Barald, K.F., and Kelley, M.W. (2004). From placode to polarization: new tunes in inner ear development. *Development* *131*, 4119–4130.

- Bastock, R., Strutt, H., and Strutt, D. (2003). Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during *Drosophila* planar polarity patterning. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 3007–3014.
- Bedrosian, J.C., Gratton, M.A., Brigande, J.V., Tang, W., Landau, J., and Bennett, J. (2006). In Vivo Delivery of Recombinant Viruses to the Fetal Murine Cochlea: Transduction Characteristics and Long-Term Effects on Auditory Function. *Mol. Ther.* *14*, 328–335.
- Beer-Hammer, S., Lee, S.C., Mauriac, S.A., Leiss, V., Groh, I.A.M., Novakovic, A., Piekorz, R.P., Bucher, K., Chen, C., Ni, K., et al. (2018). Gai Proteins are Indispensable for Hearing. *Cell. Physiol. Biochem.* *47*, 1509–1532.
- Belyantseva, I.A., Boger, E.T., and Friedman, T.B. (2003). Myosin XVa localizes to the tips of inner ear sensory cell stereocilia and is essential for staircase formation of the hair bundle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 13958–13963.
- Belyantseva, I.A., Boger, E.T., Naz, S., Frolenkov, G.I., Sellers, J.R., Ahmed, Z.M., Griffith, A.J., and Friedman, T.B. (2005). Myosin-XVa is required for tip localization of whirlin and differential elongation of hair-cell stereocilia. *Nat. Cell Biol.* *7*, 148–156.
- Berglund, A.M., and Ryugo, D.K. (1987). Hair cell innervation by spiral ganglion neurons in the mouse. *J. Comp. Neurol.* *255*, 560–570.
- Bergstralh, D.T., Dawney, N.S., and St Johnston, D. (2017). Spindle orientation: a question of complex positioning. *Dev. Camb. Engl.* *144*, 1137–1145.
- Beyer, L.A., Odeh, H., Probst, F.J., Lambert, E.H., Dolan, D.F., Camper, S.A., Kohrman, D.C., and Raphael, Y. (2000). Hair cells in the inner ear of the pirouette and shaker 2 mutant mice. *J. Neurocytol.* *29*, 227–240.
- Bhat, M.A., Izaddoost, S., Lu, Y., Cho, K.O., Choi, K.W., and Bellen, H.J. (1999). Discs Lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity. *Cell* *96*, 833–845.
- Bilder, D., and Perrimon, N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* *403*, 676–680.
- Blum, M., and Ott, T. (2018). Animal left–right asymmetry. *Curr. Biol.* *28*, R301–R304.
- Bok, J., Chang, W., and Wu, D.K. (2007). Patterning and morphogenesis of the vertebrate inner ear. *Int. J. Dev. Biol.* *51*, 521–533.
- Bok, J., Raft, S., Kong, K.-A., Koo, S.K., Dräger, U.C., and Wu, D.K. (2011). Transient retinoic acid signaling confers anterior-posterior polarity to the inner ear. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 161–166.
- Borovina, A., and Ciruna, B. (2013). IFT88 plays a cilia- and PCP-independent role in controlling oriented cell divisions during vertebrate embryonic development. *Cell Rep.* *5*, 37–43.
- Borst, J.G.G., and Soria van Hove, J. (2012). The calyx of Held synapse: from model synapse to auditory relay. *Annu. Rev. Physiol.* *74*, 199–224.
- Bothwell, S.W., Janigro, D., and Patabendige, A. (2019). Cerebrospinal fluid dynamics and intracranial pressure elevation in neurological diseases. *Fluids Barriers CNS* *16*, 9.
- Bowl, M.R., Simon, M.M., Ingham, N.J., Greenaway, S., Santos, L., Cater, H., Taylor, S., Mason, J., Kurbatova, N., Pearson, S., et al. (2017). A large scale hearing loss screen reveals an extensive unexplored genetic landscape for auditory dysfunction. *Nat. Commun.* *8*, 886.
- Bowman, S.K., Neumüller, R.A., Novatchkova, M., Du, Q., and Knoblich, J.A. (2006). The

- Drosophila* NuMA Homolog Mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division. *Dev. Cell* 10, 731–742.
- Brigande, J.V., Iten, L.E., and Fekete, D.M. (2000a). A Fate Map of Chick Otic Cup Closure Reveals Lineage Boundaries in the Dorsal Otocyst. *Dev. Biol.* 227, 256–270.
- Brigande, J.V., Iten, L.E., and Fekete, D.M. (2000b). A fate map of chick otic cup closure reveals lineage boundaries in the dorsal otocyst. *Dev. Biol.* 227, 256–270.
- Buchsbaum, I.Y., and Cappello, S. (2019a). Neuronal migration in the CNS during development and disease: insights from *in vivo* and *in vitro* models. *Development* 146, dev163766.
- Buchsbaum, I.Y., and Cappello, S. (2019b). Neuronal migration in the CNS during development and disease: insights from *in vivo* and *in vitro* models. *Development* 146, dev163766.
- Bultje, R.S., Castaneda-Castellanos, D.R., Jan, L.Y., Jan, Y.-N., Kriegstein, A.R., and Shi, S.-H. (2009). Mammalian Par3 regulates progenitor cell asymmetric division via notch signaling in the developing neocortex. *Neuron* 63, 189–202.
- Cai, C., and Shi, O. (2014). Genetic evidence in planar cell polarity signaling pathway in human neural tube defects. *Front. Med.* 8, 68–78.
- Cappuccio, G., Pinelli, M., Torella, A., Vitiello, G., D’Amico, A., Alagia, M., Del Giudice, E., Nigro, V., TUDP, and Brunetti-Pierri, N. (2017). An extremely severe phenotype attributed to WDR81 nonsense mutations. *Ann. Neurol.* 82, 650–651.
- Cavallin, M., Rujano, M.A., Bednarek, N., Medina-Cano, D., Bernabe Gelot, A., Drunat, S., Maillard, C., Garfa-Traore, M., Bole, C., Nitschké, P., et al. (2017). WDR81 mutations cause extreme microcephaly and impair mitotic progression in human fibroblasts and *Drosophila* neural stem cells. *Brain J. Neurol.* 140, 2597–2609.
- Chae, J., Kim, M.J., Goo, J.H., Collier, S., Gubb, D., Charlton, J., Adler, P.N., and Park, W.J. (1999). The *Drosophila* tissue polarity gene starry night encodes a member of the protocadherin family. *Development* 126, 5421–5429.
- Chai, G., Goffinet, A.M., and Tissir, F. (2015). Celsr3 and Fzd3 in axon guidance. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 64, 11–14.
- Chen, P., and Segil, N. (1999). p27(Kip1) links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Dev. Camb. Engl.* 126, 1581–1590.
- Chien, W.W., Isgrig, K., Roy, S., Belyantseva, I.A., Drummond, M.C., May, L.A., Fitzgerald, T.S., Friedman, T.B., and Cunningham, L.L. (2016). Gene Therapy Restores Hair Cell Stereocilia Morphology in Inner Ears of Deaf Whirler Mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 24, 17–25.
- Chudley, A.E., McCullough, C., and McCullough, D.W. (1997). Bilateral sensorineural deafness and hydrocephalus due to foramen of Monro obstruction in sibs: a newly described autosomal recessive disorder. *Am. J. Med. Genet.* 68, 350–356.
- Coleman, M.N., and Boyer, D.M. (2012). Inner ear evolution in primates through the Cenozoic: implications for the evolution of hearing. *Anat. Rec. Hoboken NJ* 2007 295, 615–631.
- Colombo, K., Grill, S.W., Kimple, R.J., Willard, F.S., Siderovski, D.P., and Gönczy, P. (2003). Translation of polarity cues into asymmetric spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Science* 300, 1957–1961.
- Copley, C.O., Duncan, J.S., Liu, C., Cheng, H., and Deans, M.R. (2013). Postnatal refinement of auditory hair cell planar polarity deficits occurs in the absence of Vangl2. *J. Neurosci. Off.*

J. Soc. Neurosci. 33, 14001–14016.

- Corda, G., and Sala, A. (2017). Non-canonical WNT/PCP signalling in cancer: Fzd6 takes centre stage. *Oncogenesis* 6, e364.
- Costa, M.R., Wen, G., Lepier, A., Schroeder, T., and Götz, M. (2008). Par-complex proteins promote proliferative progenitor divisions in the developing mouse cerebral cortex. *Development* 135, 11–22.
- Cui, C., Chatterjee, B., Francis, D., Yu, Q., SanAgustin, J.T., Francis, R., Tansey, T., Henry, C., Wang, B., Lemley, B., et al. (2011). Disruption of Mks1 localization to the mother centriole causes cilia defects and developmental malformations in Meckel-Gruber syndrome. *Dis. Model. Mech.* 4, 43–56.
- Culurgioni, S., Alfieri, A., Pendolino, V., Laddomada, F., and Mapelli, M. (2011). Inscuteable and NuMA proteins bind competitively to Leu-Gly-Asn repeat-enriched protein (LGN) during asymmetric cell divisions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 20998–21003.
- Curtin, J.A., Quint, E., Tshipouri, V., Arkell, R.M., Cattanach, B., Copp, A.J., Henderson, D.J., Spurr, N., Stanier, P., Fisher, E.M., et al. (2003). Mutation of Celsr1 disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. *Curr. Biol. CB* 13, 1129–1133.
- Dahmani, M., Ammar-Khodja, F., Bonnet, C., Lefèvre, G.M., Hardelin, J.-P., Ibrahim, H., Mallek, Z., and Petit, C. (2015). EPS8L2 is a new causal gene for childhood onset autosomal recessive progressive hearing loss. *Orphanet J. Rare Dis.* 10.
- De Marco, P., Merello, E., Piatelli, G., Cama, A., Kibar, Z., and Capra, V. (2014). Planar cell polarity gene mutations contribute to the etiology of human neural tube defects in our population. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 100, 633–641.
- Deans, M.R., Antic, D., Suyama, K., Scott, M.P., Axelrod, J.D., and Goodrich, L.V. (2007). Asymmetric Distribution of Prickle-Like 2 Reveals an Early Underlying Polarization of Vestibular Sensory Epithelia in the Inner Ear. *J. Neurosci.* 27, 3139–3147.
- Deardorff, M.A., Tan, C., Conrad, L.J., and Klein, P.S. (1998). Frizzled-8 is expressed in the Spemann organizer and plays a role in early morphogenesis. *Development* 125, 2687–2700.
- Delacroix, L., and Malgrange, B. (2015). Cochlear afferent innervation development. *Hear. Res.* 330, 157–169.
- Delprat, B., Michel, V., Goodyear, R., Yamasaki, Y., Michalski, N., El-Amraoui, A., Perfettini, I., Legrain, P., Richardson, G., Hardelin, J.-P., et al. (2005). Myosin XVa and whirlin, two deafness gene products required for hair bundle growth, are located at the stereocilia tips and interact directly. *Hum. Mol. Genet.* 14, 401–410.
- Devenport, D., and Fuchs, E. (2008). Planar polarization in embryonic epidermis orchestrates global asymmetric morphogenesis of hair follicles. *Nat. Cell Biol.* 10, 1257–1268.
- Diaz-Horta, O., Sirmaci, A., Doherty, D., Nance, W., Arnos, K., Pandya, A., and Tekin, M. (2012). GPSM2 mutations in Chudley-McCullough syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* 158A, 2972–2973.
- Diaz-Horta, O., Abad, C., Cengiz, F.B., Bademci, G., Blackwelder, P., Walz, K., and Tekin, M. (2018). Ripor2 is involved in auditory hair cell stereociliary bundle structure and orientation. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 96, 1227–1238.
- Doherty, D., Chudley, A.E., Coghlan, G., Ishak, G.E., Innes, A.M., Lemire, E.G., Rogers, R.C.,

- Mhanni, A.A., Phelps, I.G., Jones, S.J.M., et al. (2012). GPSM2 mutations cause the brain malformations and hearing loss in Chudley-McCullough syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *90*, 1088–1093.
- Donahoo, A.-L.S., and Richards, L.J. (2009). Understanding the mechanisms of callosal development through the use of transgenic mouse models. *Semin. Pediatr. Neurol.* *16*, 127–142.
- Drielsma, A., Jalas, C., Simonis, N., Désir, J., Simanovsky, N., Pirson, I., Elpeleg, O., Abramowicz, M., and Edvardson, S. (2012). Two novel CCDC88C mutations confirm the role of DAPLE in autosomal recessive congenital hydrocephalus. *J. Med. Genet.* *49*, 708–712.
- Driver, E.C., and Kelley, M.W. (2009). Specification of cell fate in the mammalian cochlea. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* *87*, 212–221.
- Driver, E.C., Northrop, A., and Kelley, M.W. (2017). Cell migration, intercalation and growth regulate mammalian cochlear extension. *Dev. Camb. Engl.* *144*, 3766–3776.
- Drummond, M.C., Barzik, M., Bird, J.E., Zhang, D.-S., Lechene, C.P., Corey, D.P., Cunningham, L.L., and Friedman, T.B. (2015). Live-cell imaging of actin dynamics reveals mechanisms of stereocilia length regulation in the inner ear. *Nat. Commun.* *6*, 6873.
- Du, Q., and Macara, I.G. (2004). Mammalian Pins Is a Conformational Switch that Links NuMA to Heterotrimeric G Proteins. *Cell* *119*, 503–516.
- Dulon, D., Papal, S., Patni, P., Cortese, M., Vincent, P.F., Tertrais, M., Emptoz, A., Tlili, A., Bouleau, Y., Michel, V., et al. (2018). Clarin-1 gene transfer rescues auditory synaptopathy in model of Usher syndrome. *J. Clin. Invest.* *128*, 3382–3401.
- Duncan, J.S., Stoller, M.L., Francl, A.F., Tissir, F., Devenport, D., and Deans, M.R. (2017). Celsr1 coordinates the planar polarity of vestibular hair cells during inner ear development. *Dev. Biol.* *423*, 126–137.
- Eaton, S. (1997). Planar polarization of Drosophila and vertebrate epithelia. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 860–866.
- Ebermann, I., Scholl, H.P.N., Charbel Issa, P., Becirovic, E., Lamprecht, J., Jurklies, B., Millán, J.M., Aller, E., Mitter, D., and Bolz, H. (2007). A novel gene for Usher syndrome type 2: mutations in the long isoform of whirlin are associated with retinitis pigmentosa and sensorineural hearing loss. *Hum. Genet.* *121*, 203–211.
- Ebrahim, S., Avenarius, M.R., Grati, M., Krey, J.F., Windsor, A.M., Sousa, A.D., Ballesteros, A., Cui, R., Millis, B.A., Salles, F.T., et al. (2016). Stereocilia-staircase spacing is influenced by myosin III motors and their cargos espin-1 and espin-like. *Nat. Commun.* *7*, 10833.
- Ekici, A.B., Hilfinger, D., Jatzwauk, M., Thiel, C.T., Wenzel, D., Lorenz, I., Boltshauser, E., Goecke, T.W., Staatz, G., Morris-Rosendahl, D.J., et al. (2010). Disturbed Wnt Signalling due to a Mutation in CCDC88C Causes an Autosomal Recessive Non-Syndromic Hydrocephalus with Medial Diverticulum. *Mol. Syndromol.* *1*, 99–112.
- Etheridge, S.L., Ray, S., Li, S., Hamblet, N.S., Lijam, N., Tsang, M., Greer, J., Kardos, N., Wang, J., Sussman, D.J., et al. (2008). Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development. *PLoS Genet.* *4*, e1000259.
- Ezan, J., and Montcouquiol, M. (2013). Revisiting planar cell polarity in the inner ear. *Semin. Cell Dev. Biol.* *24*, 499–506.
- Ezan, J., Lasvaux, L., Gezer, A., Novakovic, A., May-Simera, H., Belotti, E., Lhoumeau, A.-C.,

- Birnbaumer, L., Beer-Hammer, S., Borg, J.-P., et al. (2013a). Primary cilium migration depends on G-protein signalling control of subapical cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* *15*, 1107–1115.
- Ezan, J., Lasvaux, L., Gezer, A., Novakovic, A., May-Simera, H., Belotti, E., Lhoumeau, A.-C., Birnbaumer, L., Beer-Hammer, S., Borg, J.-P., et al. (2013b). Primary cilium migration depends on G-protein signalling control of subapical cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* *15*, 1107–1115.
- Fan, S., Hurd, T.W., Liu, C.-J., Straight, S.W., Weimbs, T., Hurd, E.A., Domino, S.E., and Margolis, B. (2004). Polarity proteins control ciliogenesis via kinesin motor interactions. *Curr. Biol. CB* *14*, 1451–1461.
- Feiguin, F., Hannus, M., Mlodzik, M., and Eaton, S. (2001). The ankyrin repeat protein Diego mediates Frizzled-dependent planar polarization. *Dev. Cell* *1*, 93–101.
- Feldner, A., Adam, M.G., Tetzlaff, F., Moll, I., Komljenovic, D., Sahm, F., Bäuerle, T., Ishikawa, H., Schroten, H., Korff, T., et al. (2017a). Loss of Mpdz impairs ependymal cell integrity leading to perinatal-onset hydrocephalus in mice. *EMBO Mol. Med.* *9*, 890–905.
- Feldner, A., Adam, M.G., Tetzlaff, F., Moll, I., Komljenovic, D., Sahm, F., Bäuerle, T., Ishikawa, H., Schroten, H., Korff, T., et al. (2017b). Loss of Mpdz impairs ependymal cell integrity leading to perinatal-onset hydrocephalus in mice. *EMBO Mol. Med.* *9*, 890–905.
- Fettiplace, R. (2017). Hair Cell Transduction, Tuning, and Synaptic Transmission in the Mammalian Cochlea. *Compr. Physiol.* *7*, 1197–1227.
- Fettiplace, R., and Hackney, C.M. (2006). The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 19–29.
- Fettiplace, R., and Kim, K.X. (2014). The physiology of mechano-electrical transduction channels in hearing. *Physiol. Rev.* *94*, 951–986.
- Fietz, S.A., and Huttner, W.B. (2011). Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis—a polarized perspective. *Curr. Opin. Neurobiol.* *21*, 23–35.
- Forge, A., Taylor, R.R., Dawson, S.J., Lovett, M., and Jagger, D.J. (2017). Disruption of SorCS2 reveals differences in the regulation of stereociliary bundle formation between hair cell types in the inner ear. *PLOS Genet.* *13*, e1006692.
- Francis, R.J.B., Christopher, A., Devine, W.A., Ostrowski, L., and Lo, C. (2012). Congenital heart disease and the specification of left-right asymmetry. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *302*, H2102–2111.
- Fritsch, B., and Elliott, K.L. (2018). Auditory Nomenclature: Combining Name Recognition With Anatomical Description. *Front. Neuroanat.* *12*, 99.
- Frolenkov, G.I. (2006). Regulation of electromotility in the cochlear outer hair cell. *J. Physiol.* *576*, 43–48.
- Frolenkov, G.I., Belyantseva, I.A., Friedman, T.B., and Griffith, A.J. (2004). Genetic insights into the morphogenesis of inner ear hair cells. *Nat. Rev. Genet.* *5*, 489–498.
- Fuchs, P.A. (2005). Time and intensity coding at the hair cell's ribbon synapse. *J. Physiol.* *566*, 7–12.
- Fukuda, T., Kominami, K., Wang, S., Togashi, H., Hirata, K. -i., Mizoguchi, A., Rikitake, Y., and Takai, Y. (2014). Aberrant cochlear hair cell attachments caused by Nectin-3 deficiency result in hair bundle abnormalities. *Development* *141*, 399–409.

- Furness, D.N., Johnson, S.L., Manor, U., Rüttiger, L., Tocchetti, A., Offenhauser, N., Olt, J., Goodyear, R.J., Vijayakumar, S., Dai, Y., et al. (2013). Progressive hearing loss and gradual deterioration of sensory hair bundles in the ears of mice lacking the actin-binding protein Eps8L2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 13898–13903.
- Garrard, S.M., Capaldo, C.T., Gao, L., Rosen, M.K., Macara, I.G., and Tomchick, D.R. (2003). Structure of Cdc42 in a complex with the GTPase-binding domain of the cell polarity protein, Par6. *EMBO J.* *22*, 1125–1133.
- Géléoc, G.S.G. (2012). [TMC1 and TMC2: key partners in hearing and vestibular function]. *Med. Sci. MS* *28*, 701–703.
- Ghimire, S.R., Ratzan, E.M., and Deans, M.R. (2018). A non-autonomous function of the core PCP protein VANGL2 directs peripheral axon turning in the developing cochlea. *Dev. Camb. Engl.* *145*.
- Giese, A.P., Ezan, J., Wang, L., Lasvaux, L., Lembo, F., Mazzocco, C., Richard, E., Reboul, J., Borg, J.-P., Kelley, M.W., et al. (2012). Gipc1 has a dual role in Vangl2 trafficking and hair bundle integrity in the inner ear. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 3775–3785.
- Gilmore, E.C., and Walsh, C.A. (2013). Genetic Causes of Microcephaly and Lessons for Neuronal Development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *2*, 461–478.
- Gomes, J.-E., Corado, M., and Schweisguth, F. (2009). Van Gogh and Frizzled Act Redundantly in the Drosophila Sensory Organ Precursor Cell to Orient Its Asymmetric Division. *PLOS ONE* *4*, e4485.
- Götz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 777–788.
- Grati, M., and Kachar, B. (2011). Myosin VIIa and sans localization at stereocilia upper tip-link density implicates these Usher syndrome proteins in mechanotransduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 11476–11481.
- Gros, J. (2009). Des mouvements cellulaires établissent l'asymétrie droite/gauche chez l'embryon de poulet. *médecine/sciences* *25*, 777–779.
- Gulsuner, S., Tekinay, A.B., Doerschner, K., Boyaci, H., Bilguvar, K., Unal, H., Ors, A., Onat, O.E., Atalar, E., Basak, A.N., et al. (2011). Homozygosity mapping and targeted genomic sequencing reveal the gene responsible for cerebellar hypoplasia and quadrupedal locomotion in a consanguineous kindred. *Genome Res.* *21*, 1995–2003.
- Hamazaki, Y., Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., and Tsukita, S. (2002). Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* *277*, 455–461.
- Hashimoto, M., and Hamada, H. (2010). Translation of anterior-posterior polarity into left-right polarity in the mouse embryo. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *20*, 433–437.
- Henderson, D.J., Long, D.A., and Dean, C.H. (2018). Planar cell polarity in organ formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *55*, 96–103.
- Higgs, H.N. (2004). There goes the neighbourhood: Eps8 joins the barbed-end crowd. *Nat. Cell Biol.* *6*, 1147–1149.
- Hirano, Y., Yoshinaga, S., Takeya, R., Suzuki, N.N., Horiuchi, M., Kohjima, M., Sumimoto, H., and Inagaki, F. (2005). Structure of a cell polarity regulator, a complex between atypical PKC and Par6 PB1 domains. *J. Biol. Chem.* *280*, 9653–9661.

- Holme, R.H., Kiernan, B.W., Brown, S.D.M., and Steel, K.P. (2002). Elongation of hair cell stereocilia is defective in the mouse mutant whirler. *J. Comp. Neurol.* *450*, 94–102.
- Holtfreter, J. (1943). A study of the mechanics of gastrulation. Part I. *J. Exp. Zool.* *94*, 261–318.
- Hutterer, A., Betschinger, J., Petronczki, M., and Knoblich, J.A. (2004). Sequential Roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the Establishment of Epithelial Polarity during *Drosophila* Embryogenesis. *Dev. Cell* *6*, 845–854.
- Isgrig, K., Shteamer, J.W., Belyantseva, I.A., Drummond, M.C., Fitzgerald, T.S., Vijayakumar, S., Jones, S.M., Griffith, A.J., Friedman, T.B., Cunningham, L.L., et al. (2017). Gene Therapy Restores Balance and Auditory Functions in a Mouse Model of Usher Syndrome. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *25*, 780–791.
- Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T., and Tsukita, S. (2001a). Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J. Cell Biol.* *154*, 491–498.
- Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T., and Tsukita, S. (2001b). Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J. Cell Biol.* *154*, 491–497.
- Jagger, D., Collin, G., Kelly, J., Towers, E., Nevill, G., Longo-Guess, C., Benson, J., Halsey, K., Dolan, D., Marshall, J., et al. (2011). Alström Syndrome protein ALMS1 localizes to basal bodies of cochlear hair cells and regulates cilium-dependent planar cell polarity. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 466–481.
- Jenny, A., Reynolds-Kenneally, J., Das, G., Burnett, M., and Mlodzik, M. (2005). Diego and Prickle regulate Frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding. *Nat. Cell Biol.* *7*, 691–697.
- Jones, C., Roper, V.C., Foucher, I., Qian, D., Banizs, B., Petit, C., Yoder, B.K., and Chen, P. (2008). Ciliary proteins link basal body polarization to planar cell polarity regulation. *Nat. Genet.* *40*, 69–77.
- Jones, C., Qian, D., Kim, S.M., Li, S., Ren, D., Knapp, L., Sprinzak, D., Avraham, K.B., Matsuzaki, F., Chi, F., et al. (2014). Ankrd6 is a mammalian functional homolog of *Drosophila* planar cell polarity gene *diego* and regulates coordinated cellular orientation in the mouse inner ear. *Dev. Biol.* *395*, 62–72.
- Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C., and Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*: II. Zygotic loci on the third chromosome. *Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol.* *193*, 283–295.
- Kaplan, N.A., Liu, X., and Tolwinski, N.S. (2009). Epithelial Polarity: Interactions Between Junctions and Apical–Basal Machinery. *Genetics* *183*, 897–904.
- Kawashima, Y., Géléoc, G.S.G., Kurima, K., Labay, V., Lelli, A., Asai, Y., Makishima, T., Wu, D.K., Della Santina, C.C., Holt, J.R., et al. (2011). Mechanotransduction in mouse inner ear hair cells requires transmembrane channel-like genes. *J. Clin. Invest.* *121*, 4796–4809.
- Kemphues, K.J., Priess, J.R., Morton, D.G., and Cheng, N. (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* *52*, 311–320.
- Khasawneh, A.H., Garling, R.J., and Harris, C.A. (2018). Cerebrospinal fluid circulation: What do we know and how do we know it? *Brain Circ.* *4*, 14–18.
- Kibar, Z., Vogan, K.J., Groulx, N., Justice, M.J., Underhill, D.A., and Gros, P. (2001). Ltap, a mammalian homolog of *Drosophila* Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural

- tube mutant Loop-tail. *Nat. Genet.* 28, 251–255.
- Kielar, M., Tuy, F.P.D., Bizzotto, S., Lebrand, C., de Juan Romero, C., Poirier, K., Oegema, R., Mancini, G.M., Bahi-Buisson, N., Olaso, R., et al. (2014). Mutations in *Eml1* lead to ectopic progenitors and neuronal heterotopia in mouse and human. *Nat. Neurosci.* 17, 923–933.
- Kikkawa, Y., Mburu, P., Morse, S., Kominami, R., Townsend, S., and Brown, S.D.M. (2005). Mutant analysis reveals whirlin as a dynamic organizer in the growing hair cell stereocilium. *Hum. Mol. Genet.* 14, 391–400.
- Kilander, M.B.C., Petersen, J., Andressen, K.W., Ganji, R.S., Levy, F.O., Schuster, J., Dahl, N., Bryja, V., and Schulte, G. (2014). Disheveled regulates precoupling of heterotrimeric G proteins to Frizzled 6. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28, 2293–2305.
- Kim, S., Lehtinen, M.K., Sessa, A., Zappaterra, M.W., Cho, S.-H., Gonzalez, D., Boggan, B., Austin, C.A., Wijnholds, J., Gambello, M.J., et al. (2010). The Apical Complex Couples Cell Fate and Cell Survival to Cerebral Cortical Development. *Neuron* 66, 69–84.
- Kishimoto, N., and Sawamoto, K. (2012). Planar polarity of ependymal cilia. *Differ. Res. Biol. Divers.* 83, S86-90.
- Klingensmith, J., Nusse, R., and Perrimon, N. (1994). The *Drosophila* segment polarity gene *dishevelled* encodes a novel protein required for response to the wingless signal. *Genes Dev.* 8, 118–130.
- van der Knaap, L.J., and van der Ham, I.J.M. (2011). How does the corpus callosum mediate interhemispheric transfer? A review. *Behav. Brain Res.* 223, 211–221.
- Komara, M., John, A., Suleiman, J., Ali, B.R., and Al-Gazali, L. (2016). Clinical and molecular delineation of dysequilibrium syndrome type 2 and profound sensorineural hearing loss in an inbred Arab family. *Am. J. Med. Genet. A.* 170A, 540–543.
- Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., and Matsuzaki, F. (2008). Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat. Cell Biol.* 10, 93–101.
- Krapivinsky, G., Medina, I., Krapivinsky, L., Gapon, S., and Clapham, D.E. (2004). SynGAP-MUPP1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA receptor potentiation. *Neuron* 43, 563–574.
- Kraut, R., Chia, W., Jan, L.Y., Jan, Y.N., and Knoblich, J.A. (1996). Role of *inscuteable* in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Nature* 383, 50–55.
- Kriegstein, A.R., and Noctor, S.C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* 27, 392–399.
- Kuchinke, U., Grawe, F., and Knust, E. (1998). Control of spindle orientation in *Drosophila* by the Par-3-related PDZ-domain protein Bazooka. *Curr. Biol. CB* 8, 1357–1365.
- Kwan, K.Y., Sestan, N., and Anton, E.S. (2012). Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development* 139, 1535–1546.
- Lawrence, P.A. (1966). Gradients in the Insect Segment: The Orientation of Hairs in the Milkweed Bug *Oncopeltus Fasciatus*. *J. Exp. Biol.* 44, 607–620.
- Lechler, T., and Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 437, 275–280.
- Leightner, A.C., Hommerding, C.J., Peng, Y., Salisbury, J.L., Gainullin, V.G., Czarnecki, P.G., Sussman, C.R., and Harris, P.C. (2013). The Meckel syndrome protein meckelin

- (TMEM67) is a key regulator of cilia function but is not required for tissue planar polarity. *Hum. Mol. Genet.* 22, 2024–2040.
- Lelli, A., Michel, V., Boutet de Monvel, J., Cortese, M., Bosch-Grau, M., Aghaie, A., Perfettini, I., Dupont, T., Avan, P., El-Amraoui, A., et al. (2016). Class III myosins shape the auditory hair bundles by limiting microvilli and stereocilia growth. *J. Cell Biol.* 212, 231–244.
- Lin, D., Edwards, A.S., Fawcett, J.P., Mbamalu, G., Scott, J.D., and Pawson, T. (2000). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat. Cell Biol.* 2, 540–547.
- Liu, M., Pereira, F.A., Price, S.D., Chu, M., Shope, C., Himes, D., Eatock, R.A., Brownell, W.E., Lysakowski, A., and Tsai, M.-J. (2000). Essential role of BETA2/NeuroD1 in development of the vestibular and auditory systems. *Genes Dev.* 14, 2839–2854.
- Lu, M.S., and Johnston, C.A. (2013). Molecular pathways regulating mitotic spindle orientation in animal cells. *Development* 140, 1843–1856.
- Lu, Q., and Adler, P.N. (2015). The diaphanous gene of *Drosophila* interacts antagonistically with multiple wing hairs and plays a key role in wing hair morphogenesis. *PLoS One* 10, e0115623.
- Lu, X., and Sipe, C.W. (2016). Developmental regulation of planar cell polarity and hair bundle morphogenesis in auditory hair cells: lessons from human and mouse genetics. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 5, 85–101.
- Lu, X., Borchers, A.G.M., Jolicoeur, C., Rayburn, H., Baker, J.C., and Tessier-Lavigne, M. (2004). PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature* 430, 93–98.
- Ma, Q., Chen, Z., Barrantes, I. del B., Luis de la Pompa, J., and Anderson, D.J. (1998). neurogenin1 Is Essential for the Determination of Neuronal Precursors for Proximal Cranial Sensory Ganglia. *Neuron* 20, 469–482.
- Macara, I.G. (2004). Parsing the polarity code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 220–231.
- Mahuzier, A., Gaudé, H.-M., Grampa, V., Anselme, I., Silbermann, F., Leroux-Berger, M., Delacour, D., Ezan, J., Montcouquiol, M., Saunier, S., et al. (2012). Dishevelled stabilization by the ciliopathy protein Rpgrip11 is essential for planar cell polarity. *J. Cell Biol.* 198, 927–940.
- Makarova, O., Roh, M.H., Liu, C.-J., Laurinec, S., and Margolis, B. (2003). Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene* 302, 21–29.
- Manor, U., Disanza, A., Grati, M., Andrade, L., Lin, H., Fiore, P.P.D., Scita, G., and Kachar, B. (2011). Regulation of stereocilia length by myosin XVa and whirlin depends on the actin-regulatory protein Eps8. *Curr. Biol. CB* 21, 167.
- Mao, Y., Mulvaney, J., Zakaria, S., Yu, T., Morgan, K.M., Allen, S., Basson, M.A., Francis-West, P., and Irvine, K.D. (2011). Characterization of a *Dchs1* mutant mouse reveals requirements for *Dchs1*-*Fat4* signaling during mammalian development. *Dev. Camb. Engl.* 138, 947–957.
- Margolis, B., and Borg, J.-P. (2005). Apicobasal polarity complexes. *J. Cell Sci.* 118, 5157–5159.
- Marín, O., Valiente, M., Ge, X., and Tsai, L.-H. (2010). Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001834.
- Marivin, A., Morozova, V., Walawalkar, I., Leyme, A., Kretov, D.A., Cifuentes, D., Dominguez, I.,

- and Garcia-Marcos, M. (2019). GPCR-independent activation of G proteins promotes apical cell constriction in vivo. *J. Cell Biol.*
- Mathur, P.D., and Yang, J. (2019). Usher syndrome and non-syndromic deafness: Functions of different whirlin isoforms in the cochlea, vestibular organs, and retina. *Hear. Res.* *375*, 14–24.
- Mauriac, S.A., Hien, Y.E., Bird, J.E., Carvalho, S.D.-S., Peyroutou, R., Lee, S.C., Moreau, M.M., Blanc, J.-M., Geysler, A., Medina, C., et al. (2017a). Defective Gpsm2/Gai3 signalling disrupts stereocilia development and growth cone actin dynamics in Chudley-McCullough syndrome. *Nat. Commun.* *8*, 14907.
- Mauriac, S.A., Hien, Y.E., Bird, J.E., Carvalho, S.D.-S., Peyroutou, R., Lee, S.C., Moreau, M.M., Blanc, J.-M., Geysler, A., Medina, C., et al. (2017b). Defective Gpsm2/Gai3 signalling disrupts stereocilia development and growth cone actin dynamics in Chudley-McCullough syndrome. *Nat. Commun.* *8*, 14907.
- May-Simera, H., and Kelley, M.W. (2012). Chapter Five - Planar Cell Polarity in the Inner Ear. In *Current Topics in Developmental Biology*, Y. Yang, ed. (Academic Press), pp. 111–140.
- May-Simera, H.L., Petralia, R.S., Montcouquiol, M., Wang, Y.-X., Szarama, K.B., Liu, Y., Lin, W., Deans, M.R., Pazour, G.J., and Kelley, M.W. (2015). Ciliary proteins Bbs8 and Ift20 promote planar cell polarity in the cochlea. *Dev. Camb. Engl.* *142*, 555–566.
- Mburu, P., Mustapha, M., Varela, A., Weil, D., El-Amraoui, A., Holme, R.H., Rump, A., Hardisty, R.E., Blanchard, S., Coimbra, R.S., et al. (2003). Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31. *Nat. Genet.* *34*, 421–428.
- McConnell, S.K. (1995). Strategies for the generation of neuronal diversity in the developing central nervous system. *J. Neurosci.* *15*, 6987–6998.
- Michel, D., Arsanto, J.-P., Massey-Harroche, D., Béclin, C., Wijnholds, J., and Le Bivic, A. (2005). PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells. *J. Cell Sci.* *118*, 4049–4057.
- Mogensen, M.M., Rzadzinska, A., and Steel, K.P. (2007). The deaf mouse mutant whirler suggests a role for whirlin in actin filament dynamics and stereocilia development. *Cell Motil. Cytoskeleton* *64*, 496–508.
- Montcouquiol, M., and Kelley, M.W. (2003). Planar and vertical signals control cellular differentiation and patterning in the mammalian cochlea. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 9469–9478.
- Montcouquiol, M., and Kelley, M.W. (2019). Development and Patterning of the Cochlea: From Convergent Extension to Planar Polarity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*
- Montcouquiol, M., Valat, J., Travo, C., and Sans, A. (1998). A role for BDNF in early postnatal rat vestibular epithelia maturation: implication of supporting cells. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 598–606.
- Montcouquiol, M., Rachel, R.A., Lanford, P.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Kelley, M.W. (2003). Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature* *423*, 173–177.
- Montcouquiol, M., Sans, N., Huss, D., Kach, J., Dickman, J.D., Forge, A., Rachel, R.A., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Bogani, D., et al. (2006). Asymmetric Localization of Vangl2 and Fz3 Indicate Novel Mechanisms for Planar Cell Polarity in Mammals. *J. Neurosci.* *26*, 5265–

5275.

- Monzack, E.L., and Cunningham, L.L. (2013). Lead roles for supporting actors: critical functions of inner ear supporting cells. *Hear. Res.* *303*, 20–29.
- Moreau, M.M., Piguel, N., Papouin, T., Koehl, M., Durand, C.M., Rubio, M.E., Loll, F., Richard, E.M., Mazzocco, C., Racca, C., et al. (2010). The Planar Polarity Protein Scribble1 Is Essential for Neuronal Plasticity and Brain Function. *J. Neurosci.* *30*, 9738–9752.
- Morin, X., Jaouen, F., and Durbec, P. (2007). Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nat. Neurosci.* *10*, 1440–1448.
- Morsli, H., Choo, D., Ryan, A., Johnson, R., and Wu, D.K. (1998). Development of the Mouse Inner Ear and Origin of Its Sensory Organs. *J. Neurosci.* *18*, 3327–3335.
- Mustapha, M., Beyer, L.A., Izumikawa, M., Swiderski, D.L., Dolan, D.F., Raphael, Y., and Camper, S.A. (2007). Whirler Mutant Hair Cells Have Less Severe Pathology than Shaker 2 or Double Mutants. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* *8*, 329–337.
- Nagai-Tamai, Y., Mizuno, K., Hirose, T., Suzuki, A., and Ohno, S. (2002). Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *7*, 1161–1171.
- Narayanan, P., Chatterton, P., Ikeda, A., Ikeda, S., Corey, D.P., Ervasti, J.M., and Perrin, B.J. (2015). Length regulation of mechanosensitive stereocilia depends on very slow actin dynamics and filament-severing proteins. *Nat. Commun.* *6*, 6855.
- Narimatsu, M., Bose, R., Pye, M., Zhang, L., Miller, B., Ching, P., Sakuma, R., Luga, V., Roncari, L., Attisano, L., et al. (2009). Regulation of planar cell polarity by Smurf ubiquitin ligases. *Cell* *137*, 295–307.
- Nayak, G.D., Ratnayaka, H.S.K., Goodyear, R.J., and Richardson, G.P. (2007). Development of the hair bundle and mechanotransduction. *Int. J. Dev. Biol.* *51*, 597–608.
- Niessen, C.M. (2007). Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function. *J. Invest. Dermatol.* *127*, 2525–2532.
- Okamoto, S., Chaya, T., Omori, Y., Kuwahara, R., Kubo, S., Sakaguchi, H., and Furukawa, T. (2017). Ick Ciliary Kinase Is Essential for Planar Cell Polarity Formation in Inner Ear Hair Cells and Hearing Function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *37*, 2073–2085.
- Pan, B., Géléoc, G.S., Asai, Y., Horwitz, G.C., Kurima, K., Ishikawa, K., Kawashima, Y., Griffith, A.J., and Holt, J.R. (2013). TMC1 and TMC2 are components of the mechanotransduction channel in hair cells of the mammalian inner ear. *Neuron* *79*, 504–515.
- Paridaen, J.T., and Huttner, W.B. (2014a). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep.* *15*, 351–364.
- Paridaen, J.T., and Huttner, W.B. (2014b). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep.* *15*, 351–364.
- Park, D.H., and Rose, L.S. (2008). Dynamic localization of LIN-5 and GPR-1/2 to cortical force generation domains during spindle positioning. *Dev. Biol.* *315*, 42–54.
- Paudyal, A., Damrau, C., Patterson, V.L., Ermakov, A., Formstone, C., Lalanne, Z., Wells, S., Lu, X., Norris, D.P., Dean, C.H., et al. (2010). The novel mouse mutant, *chuzhoi*, has disruption of Ptk7 protein and exhibits defects in neural tube, heart and lung development and abnormal planar cell polarity in the ear. *BMC Dev. Biol.* *10*, 87.
- Peng, A.W., Belyantseva, I.A., Hsu, P.D., Friedman, T.B., and Heller, S. (2009). Twinfilin 2

- regulates actin filament lengths in cochlear stereocilia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 15083–15088.
- Peyre, E., and Morin, X. (2012). An oblique view on the role of spindle orientation in vertebrate neurogenesis. *Dev. Growth Differ.* 54, 287–305.
- Peyre, E., Jaouen, F., Saadaoui, M., Haren, L., Merdes, A., Durbec, P., and Morin, X. (2011). A lateral belt of cortical LGN and NuMA guides mitotic spindle movements and planar division in neuroepithelial cells. *J. Cell Biol.* 193, 141–154.
- Peyrovian, B., Rosenblat, J.D., Pan, Z., Iacobucci, M., Brietzke, E., and McIntyre, R.S. (2019). The glycine site of NMDA receptors: A target for cognitive enhancement in psychiatric disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 92, 387–404.
- Plant, P.J., Fawcett, J.P., Lin, D.C.C., Holdorf, A.D., Binns, K., Kulkarni, S., and Pawson, T. (2003). A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nat. Cell Biol.* 5, 301–308.
- Probst, F.J., Fridell, R.A., Raphael, Y., Saunders, T.L., Wang, A., Liang, Y., Morell, R.J., Touchman, J.W., Lyons, R.H., Noben-Trauth, K., et al. (1998). Correction of deafness in shaker-2 mice by an unconventional myosin in a BAC transgene. *Science* 280, 1444–1447.
- Qian, D., Jones, C., Rzadzinska, A., Mark, S., Zhang, X., Steel, K.P., Dai, X., and Chen, P. (2007). Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev. Biol.* 306, 121–133.
- Qiu, X., and Müller, U. (2018). Mechanically Gated Ion Channels in Mammalian Hair Cells. *Front. Cell. Neurosci.* 12.
- Qu, Y., Glasco, D.M., Zhou, L., Sawant, A., Ravni, A., Fritsch, B., Damrau, C., Murdoch, J.N., Evans, S., Pfaff, S.L., et al. (2010). Atypical cadherins Celsr1-3 differentially regulate migration of facial branchiomotor neurons in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 9392–9401.
- Rachel, R.A., Murdoch, J.N., Beermann, F., Copp, A.J., and Mason, C.A. (2000). Retinal axon misrouting at the optic chiasm in mice with neural tube closure defects. *Genes. N. Y. N* 2000 27, 32–47.
- Rakic, P. (1995). A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci.* 18, 383–388.
- Raphael, Y., and Altschuler, R.A. (2003). Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res. Bull.* 60, 397–422.
- Raphael, Y., Lenoir, M., Wroblewski, R., and Pujol, R. (1991). The sensory epithelium and its innervation in the mole rat cochlea. *J. Comp. Neurol.* 314, 367–382.
- Rask-Andersen, H., Liu, W., Erixon, E., Kinnefors, A., Pfaller, K., Schrott-Fischer, A., and Glueckert, R. (2012). Human cochlea: anatomical characteristics and their relevance for cochlear implantation. *Anat. Rec. Hoboken NJ* 2007 295, 1791–1811.
- Reijntjes, D.O.J., and Pyott, S.J. (2016). The afferent signaling complex: Regulation of type I spiral ganglion neuron responses in the auditory periphery. *Hear. Res.* 336, 1–16.
- Roh, M.H., Makarova, O., Liu, C.-J., Shin, Lee, S., Laurinec, S., Goyal, M., Wiggins, R., and Margolis, B. (2002a). The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J. Cell Biol.* 157, 161–172.
- Roh, M.H., Makarova, O., Liu, C.-J., Shin, Lee, S., Laurinec, S., Goyal, M., Wiggins, R., and Margolis, B. (2002b). The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking

- mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J. Cell Biol.* *157*, 161–172.
- Roh, M.H., Fan, S., Liu, C.-J., and Margolis, B. (2003). The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells. *J. Cell Sci.* *116*, 2895–2906.
- Ross, A.J., May-Simera, H., Eichers, E.R., Kai, M., Hill, J., Jagger, D.J., Leitch, C.C., Chapple, J.P., Munro, P.M., Fisher, S., et al. (2005). Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat. Genet.* *37*, 1135–1140.
- Ruggeri, G., Timms, A.E., Cheng, C., Weiss, A., Kollros, P., Chapman, T., Tully, H., and Mirzaa, G.M. (2018). Bi-allelic mutations of *CCDC88C* are a rare cause of severe congenital hydrocephalus. *Am. J. Med. Genet. A.* *176*, 676–681.
- Rüttiger, L., Zimmermann, U., and Knipper, M. (2017). Biomarkers for Hearing Dysfunction: Facts and Outlook. *ORL J. Oto-Rhino-Laryngol. Its Relat. Spec.* *79*, 93–111.
- Rzadzinska, A., Schneider, M., Noben-Trauth, K., Bartles, J.R., and Kachar, B. (2005). Balanced levels of Espin are critical for stereociliary growth and length maintenance. *Cell Motil.* *62*, 157–165.
- Rzadzinska, A.K., Schneider, M.E., Davies, C., Riordan, G.P., and Kachar, B. (2004a). An actin molecular treadmill and myosins maintain stereocilia functional architecture and self-renewal. *J. Cell Biol.* *164*, 887–897.
- Rzadzinska, A.K., Schneider, M.E., Davies, C., Riordan, G.P., and Kachar, B. (2004b). An actin molecular treadmill and myosins maintain stereocilia functional architecture and self-renewal. *J. Cell Biol.* *164*, 887–897.
- Rzadzinska, A.K., Nevalainen, E.M., Prosser, H.M., Lappalainen, P., and Steel, K.P. (2009). Myosin VIIa interacts with Twinfilin-2 at the tips of mechanosensory stereocilia in the inner ear. *PloS One* *4*, e7097.
- Saburi, S., Hester, I., Fischer, E., Pontoglio, M., Eremina, V., Gessler, M., Quaggin, S.E., Harrison, R., Mount, R., and McNeill, H. (2008). Loss of *Fat4* disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. *Nat. Genet.* *40*, 1010–1015.
- Sala, S., Catillon, M., Hadzic, E., Schaffner-Reckinger, E., Troys, M.V., and Ampe, C. (2017). The PET and LIM1-2 domains of testin contribute to intramolecular and homodimeric interactions. *PLOS ONE* *12*, e0177879.
- Sans, N., Wang, P.Y., Du, Q., Petralia, R.S., Wang, Y.-X., Nakka, S., Blumer, J.B., Macara, I.G., and Wenthold, R.J. (2005). mPins modulates PSD-95 and SAP102 trafficking and influences NMDA receptor surface expression. *Nat. Cell Biol.* *7*, 1179–1190.
- Sans, N., Ezan, J., Moreau, M.M., and Montcouquiol, M. (2016). Chapter 13 - Planar Cell Polarity Gene Mutations in Autism Spectrum Disorder, Intellectual Disabilities, and Related Deletion/Duplication Syndromes. In *Neuronal and Synaptic Dysfunction in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability*, C. Sala, and C. Verpelli, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 189–219.
- Saugier-veber, P., Marguet, F., Lecoquierre, F., Adle-Biassette, H., Guimiot, F., Cipriani, S., Patrier, S., Brasseur-Daudruy, M., Goldenberg, A., Layet, V., et al. (2017). Hydrocephalus due to multiple ependymal malformations is caused by mutations in the *MPDZ* gene. *Acta Neuropathol. Commun.* *5*, 36.
- Schaefer, M., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Knoblich, J.A. (2000). A protein complex containing Inscuteable and the G α -binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *10*, 353–362.

- Scheffer, D.I., Zhang, D.-S., Shen, J., Indzhykulian, A., Karavitaki, K.D., Xu, Y.J., Wang, Q., Lin, J.J.-C., Chen, Z.-Y., and Corey, D.P. (2015). XIRP2, an actin-binding protein essential for inner ear hair-cell stereocilia. *Cell Rep.* *10*, 1811–1818.
- Schneider, M.E., Belyantseva, I.A., Azevedo, R.B., and Kachar, B. (2002). Rapid renewal of auditory hair bundles. *Nature* *418*, 837–838.
- Schober, M., Schaefer, M., and Knoblich, J.A. (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* *402*, 548–551.
- Sekerková, G., Richter, C.-P., and Bartles, J.R. (2011). Roles of the espin actin-bundling proteins in the morphogenesis and stabilization of hair cell stereocilia revealed in CBA/CaJ congenic jerker mice. *PLoS Genet.* *7*, e1002032.
- Self, T., Sobe, T., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Avraham, K.B., and Steel, K.P. (1999). Role of myosin VI in the differentiation of cochlear hair cells. *Dev. Biol.* *214*, 331–341.
- Shaheen, R., Sebai, M.A., Patel, N., Ewida, N., Kurdi, W., Altweijri, I., Sogaty, S., Almardawi, E., Seidahmed, M.Z., Alnemri, A., et al. (2017). The genetic landscape of familial congenital hydrocephalus. *Ann. Neurol.* *81*, 890–897.
- Shima, Y., Kengaku, M., Hirano, T., Takeichi, M., and Uemura, T. (2004). Regulation of Dendritic Maintenance and Growth by a Mammalian 7-Pass Transmembrane Cadherin. *Dev. Cell* *7*, 205–216.
- Shin, J.-B., Longo-Guess, C.M., Gagnon, L.H., Saylor, K.W., Dumont, R.A., Spinelli, K.J., Pagana, J.M., Wilmarth, P.A., David, L.L., Gillespie, P.G., et al. (2010). The R109H variant of fascin-2, a developmentally regulated actin crosslinker in hair-cell stereocilia, underlies early-onset hearing loss of DBA/2J mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 9683–9694.
- Shin, K., Fogg, V.C., and Margolis, B. (2006). Tight junctions and cell polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *22*, 207–235.
- Siletti, K., Tarchini, B., and Hudspeth, A.J. (2017). Daple coordinates organ-wide and cell-intrinsic polarity to pattern inner-ear hair bundles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, E11170–E11179.
- Siller, K.H., Cabernard, C., and Doe, C.Q. (2006). The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nat. Cell Biol.* *8*, 594–600.
- Singh, J., and Mlodzik, M. (2012). Planar Cell Polarity Signaling: Coordination of cellular orientation across tissues. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *1*, 479.
- Sipe, C.W., and Lu, X. (2011). Kif3a regulates planar polarization of auditory hair cells through both ciliary and non-ciliary mechanisms. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 3441–3449.
- Sitek, B., Poschmann, G., Schmidtke, K., Ullmer, C., Maskri, L., Andriske, M., Stichel, C.C., Zhu, X.-R., and Luebbert, H. (2003). Expression of MUPP1 protein in mouse brain. *Brain Res.* *970*, 178–187.
- Sokol, S.Y. (1996). Analysis of Dishevelled signalling pathways during *Xenopus* development. *Curr. Biol. CB* *6*, 1456–1467.
- Song, H., Hu, J., Chen, W., Elliott, G., Andre, P., Gao, B., and Yang, Y. (2010). Planar cell polarity breaks bilateral symmetry by controlling ciliary positioning. *Nature* *466*, 378–382.
- Sowers, L.P., Loo, L., Wu, Y., Campbell, E., Ulrich, J.D., Wu, S., Paemka, L., Wassink, T., Meyer, K., Bing, X., et al. (2013). Disruption of the non-canonical Wnt gene PRICKLE2 leads to autism-like behaviors with evidence for hippocampal synaptic dysfunction. *Mol. Psychiatry* *18*, 1077–1089.

- Stoller, M.L., Roman, O., and Deans, M.R. (2018). Domineering non-autonomy in Vangl1;Vangl2 double mutants demonstrates intercellular PCP signaling in the vertebrate inner ear. *Dev. Biol.* 437, 17–26.
- Strutt, D.I. (2001). Asymmetric localization of frizzled and the establishment of cell polarity in the *Drosophila* wing. *Mol. Cell* 7, 367–375.
- Strutt, D., and Strutt, H. (2007). Differential activities of the core planar polarity proteins during *Drosophila* wing patterning. *Dev. Biol.* 302, 181–194.
- Strutt, D., and Warrington, S.J. (2008). Planar polarity genes in the *Drosophila* wing regulate the localisation of the FH3-domain protein Multiple Wing Hairs to control the site of hair production. *Development* 135, 3103–3111.
- Strutt, H., and Strutt, D. (2009). Asymmetric localisation of planar polarity proteins: Mechanisms and consequences. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 957–963.
- Suárez, R., Gobius, I., and Richards, L.J. (2014). Evolution and development of interhemispheric connections in the vertebrate forebrain. *Front. Hum. Neurosci.* 8, 497.
- Suzuki, A., Yamanaka, T., Hirose, T., Manabe, N., Mizuno, K., Shimizu, M., Akimoto, K., Izumi, Y., Ohnishi, T., and Ohno, S. (2001). Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J. Cell Biol.* 152, 1183–1196.
- Suzuki, J., Hashimoto, K., Xiao, R., Vandenberghe, L.H., and Liberman, M.C. (2017). Cochlear gene therapy with ancestral AAV in adult mice: complete transduction of inner hair cells without cochlear dysfunction. *Sci. Rep.* 7, 45524.
- Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kempfues, K.J., Miwa, J., and Ohno, S. (1998). Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Camb. Engl.* 125, 3607–3614.
- Tadenev, A.L.D., Akturk, A., Devanney, N., Mathur, P.D., Clark, A.M., Yang, J., and Tarchini, B. (2019). GPSM2-GNAI Specifies the Tallest Stereocilia and Defines Hair Bundle Row Identity. *Curr. Biol. CB.*
- Takagishi, M., Sawada, M., Ohata, S., Asai, N., Enomoto, A., Takahashi, K., Weng, L., Ushida, K., Ara, H., Matsui, S., et al. (2017). Daple Coordinates Planar Polarized Microtubule Dynamics in Ependymal Cells and Contributes to Hydrocephalus. *Cell Rep.* 20, 960–972.
- Takekuni, K., Ikeda, W., Fujito, T., Morimoto, K., Takeuchi, M., Monden, M., and Takai, Y. (2003). Direct binding of cell polarity protein PAR-3 to cell-cell adhesion molecule nectin at neuroepithelial cells of developing mouse. *J. Biol. Chem.* 278, 5497–5500.
- Tao, H., Manak, J.R., Sowers, L., Mei, X., Kiyonari, H., Abe, T., Dahdaleh, N.S., Yang, T., Wu, S., Chen, S., et al. (2011). Mutations in prickle orthologs cause seizures in flies, mice, and humans. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 138–149.
- Tarchini, B., Jolicoeur, C., and Cayouette, M. (2013). A Molecular Blueprint at the Apical Surface Establishes Planar Asymmetry in Cochlear Hair Cells. *Dev. Cell* 27, 88–102.
- Tarchini, B., Tadenev, A.L.D., Devanney, N., and Cayouette, M. (2016). A link between planar polarity and staircase-like bundle architecture in hair cells. *Development* 143, 3926–3932.
- Taylor, J., Abramova, N., Charlton, J., and Adler, P.N. (1998). Van Gogh: a new *Drosophila* tissue polarity gene. *Genetics* 150, 199–210.
- Taylor, R., Bullen, A., Johnson, S.L., Grimm-Günter, E.-M., Rivero, F., Marcotti, W., Forge, A., and

- Daudet, N. (2015). Absence of plastin 1 causes abnormal maintenance of hair cell stereocilia and a moderate form of hearing loss in mice. *Hum. Mol. Genet.* 24, 37–49.
- Tepass, U., and Knust, E. (1993). Crumbs and Stardust act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 159, 311–326.
- Tilney, L.G., Derosier, D.J., and Mulroy, M.J. (1980). The organization of actin filaments in the stereocilia of cochlear hair cells. *J. Cell Biol.* 86, 244–259.
- Tilney, L.G., Tilney, M.S., and DeRosier, D.J. (1992). Actin filaments, stereocilia, and hair cells: how cells count and measure. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 257–274.
- Tissir, F., and Goffinet, A.M. (2006). Expression of planar cell polarity genes during development of the mouse CNS. *Eur. J. Neurosci.* 23, 597–607.
- Tissir, F., and Goffinet, A.M. (2010). Planar cell polarity signaling in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 572–577.
- Tissir, F., Bar, I., Jossin, Y., De Backer, O., and Goffinet, A.M. (2005). Protocadherin *Celsr3* is crucial in axonal tract development. *Nat. Neurosci.* 8, 451–457.
- Tissir, F., Qu, Y., Montcouquiol, M., Zhou, L., Komatsu, K., Shi, D., Fujimori, T., Labeau, J., Tyteca, D., Courtoy, P., et al. (2010). Lack of cadherins *Celsr2* and *Celsr3* impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nat. Neurosci.* 13, 700–707.
- Torban, E., Patenaude, A.-M., Leclerc, S., Rakowiecki, S., Gauthier, S., Andelfinger, G., Epstein, D.J., and Gros, P. (2008). Genetic interaction between members of the *Vangl* family causes neural tube defects in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 3449–3454.
- Trapani, I., and Auricchio, A. (2018). Seeing the Light after 25 Years of Retinal Gene Therapy. *Trends Mol. Med.* 24, 669–681.
- Tree, D.R.P., Shulman, J.M., Rousset, R., Scott, M.P., Gubb, D., and Axelrod, J.D. (2002). Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling. *Cell* 109, 371–381.
- Ueno, N., and Greene, N.D.E. (2003). Planar cell polarity genes and neural tube closure. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 69, 318–324.
- Unterberger, I., Bauer, R., Walser, G., and Bauer, G. (2016). Corpus callosum and epilepsies. *Seizure - Eur. J. Epilepsy* 37, 55–60.
- Usui, T., Shima, Y., Shimada, Y., Hirano, S., Burgess, R.W., Schwarz, T.L., Takeichi, M., and Uemura, T. (1999). Flamingo, a Seven-Pass Transmembrane Cadherin, Regulates Planar Cell Polarity under the Control of Frizzled. *Cell* 98, 585–595.
- Vinson, C.R., and Adler, P.N. (1987). Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of *Drosophila*. *Nature* 329, 549–551.
- Vivancos, V., Chen, P., Spassky, N., Qian, D., Dabdoub, A., Kelley, M., Studer, M., and Guthrie, S. (2009). Wnt activity guides facial branchiomotor neuron migration, and involves the PCP pathway and JNK and ROCK kinases. *Neural Develop.* 4, 7.
- Wallingford, J.B. (2012). Planar cell polarity and the developmental control of cell behavior in vertebrate embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 627–653.
- Walsh, T., Shahin, H., Elkan-Miller, T., Lee, M.K., Thornton, A.M., Roeb, W., Abu Rayyan, A., Lulus, S., Avraham, K.B., King, M.-C., et al. (2010). Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein *GPSM2* as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 90–94.

- Wang, Q., and Margolis, B. (2007). Apical junctional complexes and cell polarity. *Kidney Int.* 72, 1448–1458.
- Wang, J., Mark, S., Zhang, X., Qian, D., Yoo, S.-J., Radde-Gallwitz, K., Zhang, Y., Lin, X., Collazo, A., Wynshaw-Boris, A., et al. (2005). Regulation of polarized extension and planar cell polarity in the cochlea by the vertebrate PCP pathway. *Nat. Genet.* 37, 980–985.
- Wang, L., Zou, J., Shen, Z., Song, E., and Yang, J. (2012a). Whirlin interacts with espin and modulates its actin-regulatory function: an insight into the mechanism of Usher syndrome type II. *Hum. Mol. Genet.* 21, 692–710.
- Wang, L., Jiang, H., and Brigande, J.V. (2012b). Gene transfer to the developing mouse inner ear by in vivo electroporation. *J. Vis. Exp. JoVE.*
- Wang, Q., Hurd, T.W., and Margolis, B. (2004). Tight junction protein Par6 interacts with an evolutionarily conserved region in the amino terminus of PALS1/stardust. *J. Biol. Chem.* 279, 30715–30721.
- Wang, X., Tsai, J.-W., LaMonica, B., and Kriegstein, A.R. (2011). A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat. Neurosci.* 14, 555–561.
- Wang, Y., Guo, N., and Nathans, J. (2006). The Role of Frizzled3 and Frizzled6 in Neural Tube Closure and in the Planar Polarity of Inner-Ear Sensory Hair Cells. *J. Neurosci.* 26, 2147–2156.
- Wansleeben, C., Feitsma, H., Montcouquiol, M., Kroon, C., Cuppen, E., and Meijlink, F. (2010). Planar cell polarity defects and defective Vangl2 trafficking in mutants for the COPII gene *Sec24b*. *Dev. Camb. Engl.* 137, 1067–1073.
- Warchol, M.E. (2007). Characterization of supporting cell phenotype in the avian inner ear: implications for sensory regeneration. *Hear. Res.* 227, 11–18.
- Warchol, M.E., and Montcouquiol, M. (2010). Maintained Expression of the Planar Cell Polarity Molecule Vangl2 and Reformation of Hair Cell Orientation in the Regenerating Inner Ear. *JARO J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 11, 395–406.
- Wen, W., and Zhang, M. (2018). Protein Complex Assemblies in Epithelial Cell Polarity and Asymmetric Cell Division. *J. Mol. Biol.* 430, 3504–3520.
- Wigglesworth, V.B. (1940). Local and General Factors in the Development of “Pattern” in *Rhodnius Prolixus* (Hemiptera). *J. Exp. Biol.* 17, 180–201.
- Winter, C.G., Wang, B., Ballew, A., Royou, A., Karess, R., Axelrod, J.D., and Luo, L. (2001). *Drosophila* Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell* 105, 81–91.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U., and Knust, E. (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 402, 544–547.
- Wong, L.L. (1993). Tissue polarity genes of *Drosophila* regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells. *J. Cell Biol.* 123, 209–221.
- Wong, H.-C., Bourdelas, A., Krauss, A., Lee, H.-J., Shao, Y., Wu, D., Mlodzik, M., Shi, D.-L., and Zheng, J. (2003). Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol. Cell* 12, 1251–1260.
- Wu, D.K., and Kelley, M.W. (2012). Molecular mechanisms of inner ear development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a008409.
- Wu, J., and Mlodzik, M. (2008). The frizzled extracellular domain is a ligand for Van Gogh/Stbm

- during nonautonomous planar cell polarity signaling. *Dev. Cell* 15, 462–469.
- Yamamoto, S., Nishimura, O., Misaki, K., Nishita, M., Minami, Y., Yonemura, S., Tarui, H., and Sasaki, H. (2008). Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. *Dev. Cell* 15, 23–36.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Kitamura, K., Maniwa, R., Nagai, Y., Yamashita, A., Hirose, T., Ishikawa, H., et al. (2001). PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 6, 721–731.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Iwamatsu, A., Shinohara, A., and Ohno, S. (2003). Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr. Biol. CB* 13, 734–743.
- Yan, J., Lu, Q., Fang, X., and Adler, P.N. (2009). Rho1 has multiple functions in *Drosophila* wing planar polarity. *Dev. Biol.* 333, 186–199.
- Yang, J., Simonneau, C., Kilker, R., Oakley, L., Byrne, M.D., Nichtova, Z., Stefanescu, I., Pardeep-Kumar, F., Tripathi, S., Londin, E., et al. (2019). Murine MPDZ-linked hydrocephalus is caused by hyperpermeability of the choroid plexus. *EMBO Mol. Med.* 11.
- Yariz, K.O., Walsh, T., Akay, H., Duman, D., Akkaynak, A.C., King, M.-C., and Tekin, M. (2012). A truncating mutation in GPSM2 is associated with recessive non-syndromic hearing loss. *Clin. Genet.* 81, 289–293.
- Yin, C., Kiskowski, M., Pouille, P.-A., Farge, E., and Solnica-Krezel, L. (2008). Cooperation of polarized cell intercalations drives convergence and extension of presomitic mesoderm during zebrafish gastrulation. *J. Cell Biol.* 180, 221–232.
- Yin, H., Copley, C.O., Goodrich, L.V., and Deans, M.R. (2012). Comparison of phenotypes between different vangl2 mutants demonstrates dominant effects of the Looptail mutation during hair cell development. *PLoS One* 7, e31988.
- Ying, G., Avasthi, P., Irwin, M., Gerstner, C.D., Frederick, J.M., Lucero, M.T., and Baehr, W. (2014). Centrin 2 is required for mouse olfactory ciliary trafficking and development of ependymal cilia planar polarity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 6377–6388.
- Zallen, J.A. (2007). Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell* 129, 1051–1063.
- Zampini, V., Rüttiger, L., Johnson, S.L., Franz, C., Furness, D.N., Waldhaus, J., Xiong, H., Hackney, C.M., Holley, M.C., Offenhauser, N., et al. (2011). Eps8 regulates hair bundle length and functional maturation of mammalian auditory hair cells. *PLoS Biol.* 9, e1001048.
- Zdebik, A.A., Wangemann, P., and Jentsch, T.J. (2009). Potassium ion movement in the inner ear: insights from genetic disease and mouse models. *Physiol. Bethesda Md* 24, 307–316.
- Zhao, B., Wu, Z., and Müller, U. (2016). Murine Fam65b forms ring-like structures at the base of stereocilia critical for mechanosensory hair cell function. *ELife* 5.
- Zigman, M., Cayouette, M., Charalambous, C., Schleiffer, A., Hoeller, O., Dunican, D., McCudden, C.R., Firnberg, N., Barres, B.A., Siderovski, D.P., et al. (2005). Mammalian inscuteable regulates spindle orientation and cell fate in the developing retina. *Neuron* 48, 539–545.

Annexes

Nom (Invertébrés)	Nom (mammifères)	Sub localisation cellulaire	Expression dans l'épithélium cochléaire	Souris Mutantes	Phénotypes mutants	Références
Strabismus (Stbm) / Van Gogh (Vang)	Van Gogh Like 1-2 (Vangl)	Transmembranaire	Pôle distal des CS	<i>Loop tail (Lp/Lp) : mutation spontanée de Vangl2</i>	Phénotype PCP	Montcouquiol et al., 2003
				<i>Vangl1^{-/-}</i>	Phénotype PCP léger comparé à la mutation <i>Vangl2^{Lp/Lp}</i>	Torban et al., 2008
				<i>Vangl2 KO (Vangl2^{ΔTMs/ΔTMs})</i>	Lethal (Craniorachischisis) - phénotype PCP	Copley et al., 2012, Yin et al., 2012
				<i>Vangl2 CKO (Pax2^{cre})</i>	Phénotype PCP Gradient de sévérité CCI<CCE1<CCE2<CCE3 - Restauration du phénotype en post natal	Copley et al., 2012
				<i>Vangl2^{Lp/ΔTMs}</i>	Phénotype PCP plus fort que le mutant <i>Vangl2^{ΔTMs/ΔTMs}</i> (Effet dominant négatif de la mutation <i>Lp</i>)	Yin et al., 2012
				<i>Vangl1^{+/-} / Vangl2^{+/-} cKO</i>	Sévère phénotype PCP	Torban et al., 2008
Frizzled (Fz)	Frizzled 1 à 10 (Fz)	Transmembranaire	Pôle proximal de la CC	<i>FZ3^{-/-} / FZ6^{-/-}</i>	Phénotype PCP	Wang et al., 2006
Flamingo (Fmi) / Starry night (Stan)	Celsr 1, 2 et 3 (Celsr)	Transmembranaire	Pôle proximal et distal de la CC	<i>spin cycle (Scy) et crash (Crsh) : Mutation spontanée de Celsr1</i>	Phénotype PCP	Curtin et al., 2003
				<i>Celsr1 KO</i>	Phénotype PCP	Ducan et al., 2017 ;
Dishevelled (Dsh)	Dishevelled 1, 2 et 3 (Dvl)	Cytosolique	Pôle distal de la CC	<i>Dvl1^{-/-} ; Dvl2^{-/-} ; Dvl3^{-/-} ; Dvl1^{+/-} / Dvl3^{-/-}</i>	Orientation normale des touffes ciliaires	Wang et al., 2005 ; Etheridge et al., 2008
				<i>Dvl2^{+/-} / Dvl3^{+/-} ; Dvl1^{+/-} / Dvl3^{-/-} ; Dvl1^{+/-} / Dvl2^{+/-}</i>	Phénotype PCP	
Prickle (Pk) / Spiny leg (Sp1e)	Prickle like 1 à 4 (Pk)	Cytosolique	Non exprimée	Mort embryonnaire	-	Deans et al., 2007
Diego (Dgo)	Ankrd6 / Inversin / divertin	Cytosolique	Pôle proximal de la CC	<i>Ankrd6^{-/-} et Ankrd6^{-/-} ; Vangl2^{+lp}</i>	Phénotype PCP que en présence d'une mutation hétérozygote de <i>Vangl2</i>	Jones et al., 2014

Tableau 4 : Résumé des mutants murins possédant une mutation des gènes centraux de la PCP et de leurs phénotypes cochléaires.

Nom du gène	N° de la mutation	Sexe	Âge	Catégorie mutation	Mutation de l'ADN	Mutation de la protéine	Phénotypes	Commentaires	Références	
Hyc1 / Duple / CCDC80C	Hyc1 #1	F	3 ans	Homozygote	505B+1G>A	S1591HfsX7	Hydrocéphalie avec dilatation des ventricules latéraux	Sténose de l'aqueduc de Sylvius	Elci et al., 2010	
	Hyc1 #2	F	19 ans	Homozygote	894C>T	R312X	Hydrocéphalie, retard intellectuel léger, anomalies motrice		Même famille	
		M	18 ans	Homozygote	894C>T	R312X	Hydrocéphalie, retard intellectuel sévère, anomalies motrice			
		F	16 ans	Homozygote	894C>T	R312X	Hydrocéphalie, retard d'apprentissage			
	Hyc1 #3	F	2 ans	Homozygote	894C>T	R312X	Hydrocéphalie		Drielsma et al., 2012	
		F	Fœtus	Homozygote	-	E1949GfsX26	Hydrocéphalie, anomalie de taille du cerveaulet			
		F	Fœtus	Homozygote	-	E1949GfsX26	Hydrocéphalie, anomalie de taille du cerveaulet			
	Hyc1 #4	F	Fœtus	Homozygote	-	E1949GfsX26	Hydrocéphalie, anomalie de taille du cerveaulet		Augerment - Même mère	
		F	Fœtus	Homozygote	-	E1949GfsX26	Hydrocéphalie, anomalie de taille du cerveaulet			
		F	Fœtus	Homozygote	-	E1949GfsX26	Hydrocéphalie, anomalie de taille du cerveaulet			
	Hyc1 #5	M	61 ans	Homozygote	G139A	R464H	Ataxie spinocérébelleuse		Tsoi et al., 2015	
		M	64 ans	Homozygote	G139A	R464H	Ataxie spinocérébelleuse			
		M	14 ans	Homozygote	5553dupC	S1852OfsX4	Hydrocéphalie, retard intellectuel, sténose de l'aqueduc de Sylvius			
	Hyc1 #6	M	-	Homozygote	5553dupC	S1852OfsX4	Hydrocéphalie, retard intellectuel, morphologie des os du crâne anormale, hypoplasie du corps calleux, sténose de l'aqueduc de Sylvius		Décédé	
		M	-	Homozygote	5553dupC	S1852OfsX4	Hydrocéphalie, retard intellectuel, morphologie des os du crâne anormale, hypoplasie du corps calleux, sténose de l'aqueduc de Sylvius			
M		-	Homozygote	5553dupC	S1852OfsX4	Hydrocéphalie, retard intellectuel, morphologie des os du crâne anormale, hypoplasie du corps calleux, sténose de l'aqueduc de Sylvius				
Hyc2 / Mpdz	Hyc2 #1	F	2,5 ans	Homozygote	4468delA	Q1480Rfs19	Hydrocéphalie, polyhydramnios, datation de ventricules latéraux et du 3ème ventricule, hétérotopie de la matière grise, malformation cardiaque, hernie du diaphragme, malformation oculaire, retard de développement, malformation des os de la face, asymétrie de la face		Shahen et al., 2017	
	Hyc2 #2	M	8 ans	Hétérozygote	2230C>T; 3211G>T	R744X; R1071X	Hydrocéphalie, surdités, anomalies oculaires, hypoplasie des poulmons, mauvais rotation de l'intestin, malformation de certaines veines et artères, petites dents, hétérotopies de la substance grise, dilatation des ventricules latéraux, petits bulbes olfactifs, malformation des os du crâne			
	Hyc2 #3	M	15 mois	Homozygote	5278 G>A	A1700T	Hydrocéphalie, malformation rénale, macrocéphalie, malformation oculaire, hypotonie, délation du 3ème et 4ème ventricule, né à terme mais de petite taille	Possède aussi une mutation homozygote du gène UPE (C370-574G>A; p.L182Ffs3)		
	Hyc2 #4	F	Fœtus	Homozygote	628C>T	Q210X	Sévere hydrocéphalie, dilatation bilatérale des ventricules latéraux, dysgénésie ou agénésie du corps calleux, isencéphalie probable, anomalie de la taille du cerveaulet, hypotonie, anomalies oculaire	Même famille		
		M	24 ans	Homozygote	628C>T	Q210X	Sévere hydrocéphalie, dilatation bilatérale des ventricules latéraux, dysgénésie ou agénésie du corps calleux, isencéphalie probable, anomalie de la taille du cerveaulet, hypotonie, anomalies oculaire			
		F	12 ans	Homozygote	628C>T	Q210X	Hydrocéphalie (éhunt), retard intellectuel, intellectuel, anomalies visuelles			
	Hyc2 #5	F	25 ans	Homozygote	628C>T	Q210X	Hydrocéphalie (éhunt), macrocéphalie, dysgénésie du corps calleux			Même famille
		F	Fœtus	Homozygote	1291-1294del	V431Mfs14	Hydrocéphalie, dysgénésie ou agénésie du corps calleux			
		F	Fœtus	Homozygote	1291-1294del	V431Mfs14	Hydrocéphalie, bilatéral ventriculomégale			
	Hyc2 #6	F	Fœtus	Homozygote	539+G>T	-	Ventriculomégale	Malformation des cellules neurogènes le long de l'aqueduc de Sylvius, du 3ème et du 4ème ventricule		avortement et même mère
		F	Fœtus	Homozygote	539+G>T	-	Ventriculomégale	Malformation des cellules neurogènes le long de l'aqueduc de Sylvius, du 3ème et du 4ème ventricule		
		F	Fœtus	Homozygote	539+G>T	-	Ventriculomégale	Malformation des cellules neurogènes le long de l'aqueduc de Sylvius, du 3ème et du 4ème ventricule		
	Hyc2 #7	-	Fœtus	Homozygote	2248C>T	R750X	Sévere hydrocéphalie	empêchant l'écoulement du liquide céphalorachidien.		Saugher-Veber et al., 2017
		-	Fœtus	Homozygote	2248C>T	R750X	Sévere hydrocéphalie			
		-	Fœtus	Homozygote	2248C>T	R750X	Sévere hydrocéphalie			
Hyc2 #8	M	17 mois	Hétérozygote	394G>A; 1744C>G	G132S; L582V	Hydrocéphalie, dilatation des ventricules latéraux et du 3ème ventricule		Al-Jezawi et al., 2018		

Tableau 5 : Résumé des mutations et des phénotypes associés à la mutation des gènes *Duple*, *Mpdz*, *WDR81*.

Nom gène	N° de la mutation	Sexe	Âge	Catégorie mutation	Mutation ADN	Mutation protein			Protéine exprimée dans le CC et le cervelet		
Hyc3 / WDR81	Hyc3 #1	-	-	Homozygote	c.2567C>T	P85L	Hypoplasie du cervelet et problème moteur			Guluner et al., 2011	
	Hyc3 #2	F	3 ans	Homozygote	c.3997C>T	R133X	Surdité profonde précoce, retard de développement, retard moteur (difficulté à marcher), retard du langage, atrophie légère du cervelet		Mutation LHPL5 (c.472C>T ; R159W) + Mutation OTDF (c.3470G>A ; R157Q)	Komara et al., 2015	
	Hyc3 #3	F	7 ans	Homozygote	c.3997C>T	R133X	Retard de développement, atrophie et hypoplasie du cervelet, retard du langage, retard à la marche, difficultés sociales			Alazami et al., 2015	
	Hyc3 #4	-	Fœtus	Homozygote	c.845G>A	G28E	Hydranencéphalie, hypoplasie du cervelet			Mort néonatale	
	Hyc3 #5	M	In utero	Homozygote	c.845G>A	G28E	Hydrocéphalie, absence de cervelet				
	Hyc3 #6	M	In utero	Homozygote	c.3298C>T	Q108X	Hydrocéphalie, hypoplasie du cervelet				Shaheen et al., 2017
	Hyc3 #7	F	3 ans	Hétérozygote	1882C>T ; 3713C>G	Q638X ; P1238R	Extrême microcéphalie, problèmes moteurs, problème de développement, test auditif et oculaire normal, diminution du nombre de circonvolution, atrophie du cervelet légère				
	Hyc3 #8	F	22 ans	Hétérozygote	1582C>T ; 4039-4041dup	H628Y ; Y1946-11347dup	Extrême microcéphalie				
	Hyc3 #9	F	17 ans	Hétérozygote	3820-3838del ; 5453G>T	P1647_T1556 ; G1818V	Extrême microcéphalie				
	Hyc3 #10	F	Fœtus	Hétérozygote	2834-2837delTTT ; 5464C>T	F9485p.T17 ; R1822X	Agénésie du corps calleux, hypoplasie du cervelet				Cavallin et al., 2017
EML1	Hyc3 #9	F	Fœtus	Hétérozygote	1735G>A ; 13584dup	G579R ; Y453X	Microcéphalie, faible présence de circonvolution, agénésie du corps calleux, hypoplasie du cervelet		Jumelles		
	Hyc3 #10	F	Fœtus	Hétérozygote	1735G>A ; 13586dup	G579R ; Y453X	Microcéphalie, faible présence de circonvolution, agénésie du corps calleux, hypoplasie du cervelet				
		M	13 ans	Hétérozygote	1735G>A ; 13584dup	G579R ; Y453X	Extrême microcéphalie				
		F	17 ans	Hétérozygote	C.84G>A ; c.1885C>T	W28X ; P819X	Microcéphalie sévère, agénésie du CC, gliucoma, malformation faciale, développement anormal, hypoplasie des reins, retard mental et visuel anormal, anomalie du squelette, mauvaise rotation de l'intestin, présence de deux rates, pancréatite				Cappuccio et al., 2017
	EML1 #1	-	-	Hétérozygote	c.481C>T ; c.796A>G	R138X ; T273A	Hydrocéphalie, hétérotopie, polymicrogyrie, agénésie du corps calleux, épilepsie, retard mental			3 enfants de la même famille	Kedar et al., 2014
	EML1 #2	-	Fœtus	Homozygote	c.673T>C	W225R	Hydrocéphalie, hétérotopie, polymicrogyrie, agénésie du corps calleux				
	EML1 #3	F	2 ans	Homozygote	c.1567C>T	R523X	Hydrocéphalie, retard de développement, épilepsie, polymicrogyrie, agénésie du corps calleux, dilatation des ventricules				Shaheen et al., 2017

Tableau 5 (suite) : Résumé des mutations et des phénotypes associés à la mutation des gènes Daple, Mpdz, WDR81.

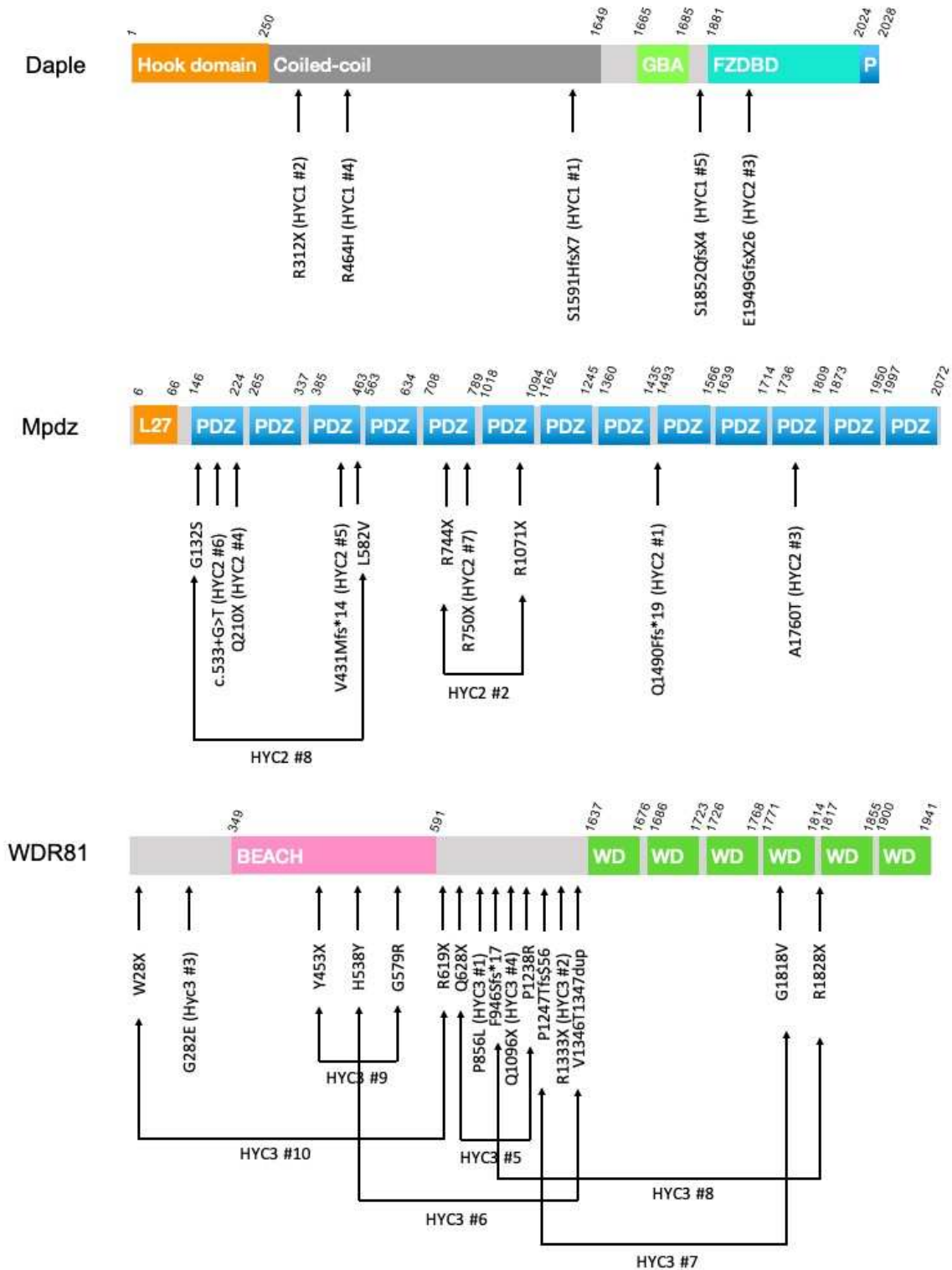


Figure 33 : Représentation schématique des différentes protéines du complexe HYC. Les flèches représentent la localisation des différentes mutations décrites chez l'homme, les numéros (#) représentent de façon arbitraire les différentes mutations décrites chez l'homme rapportées dans le *tableau 5*.

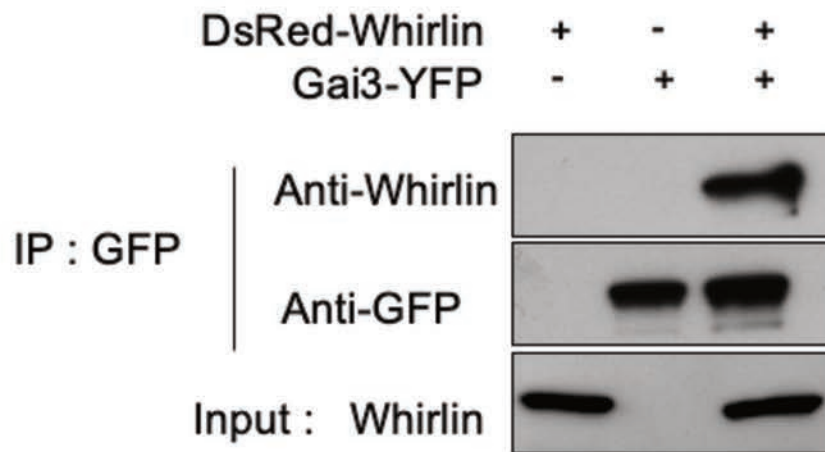


Figure 34 : Interaction entre Gai3 et la Whirlin. Immunoprécipitation effectuée à partir de cellules hétérologues HEK293T en surexpression.

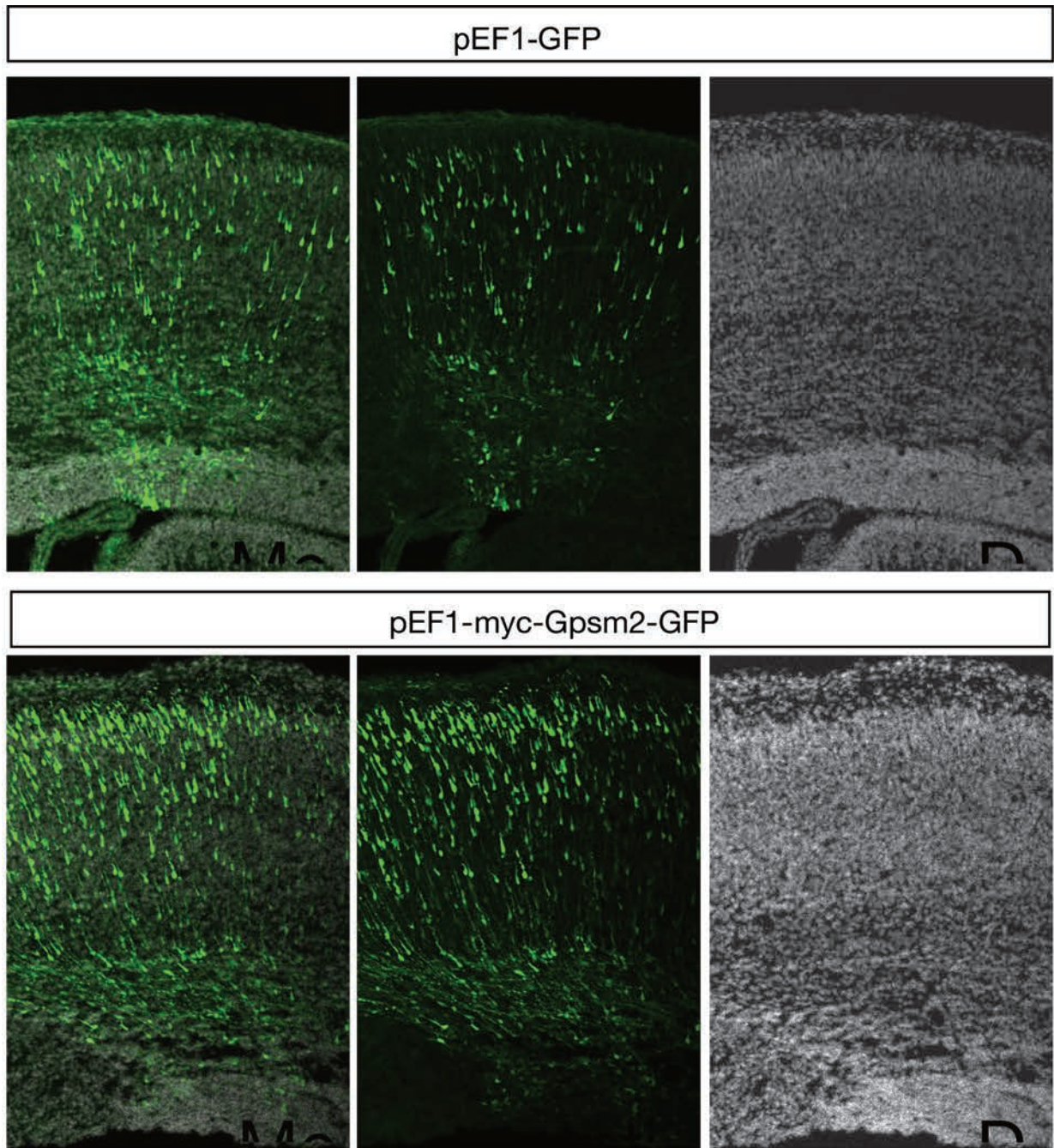


Figure 35 : Surexpression de Gpsm2^{FL} par électroporation *in utero*. Données préliminaires obtenues correspondant à des coupes coronales de cortex à E17,5 de souris électroporées à E14,5 soit par un plasmide contrôle (pEF1-GFP) ou par un plasmide codant pour la forme entière de Gpsm2 (Gpsm2^{FL}: pEF1-myc-Gpsm2^{FL}-GFP).

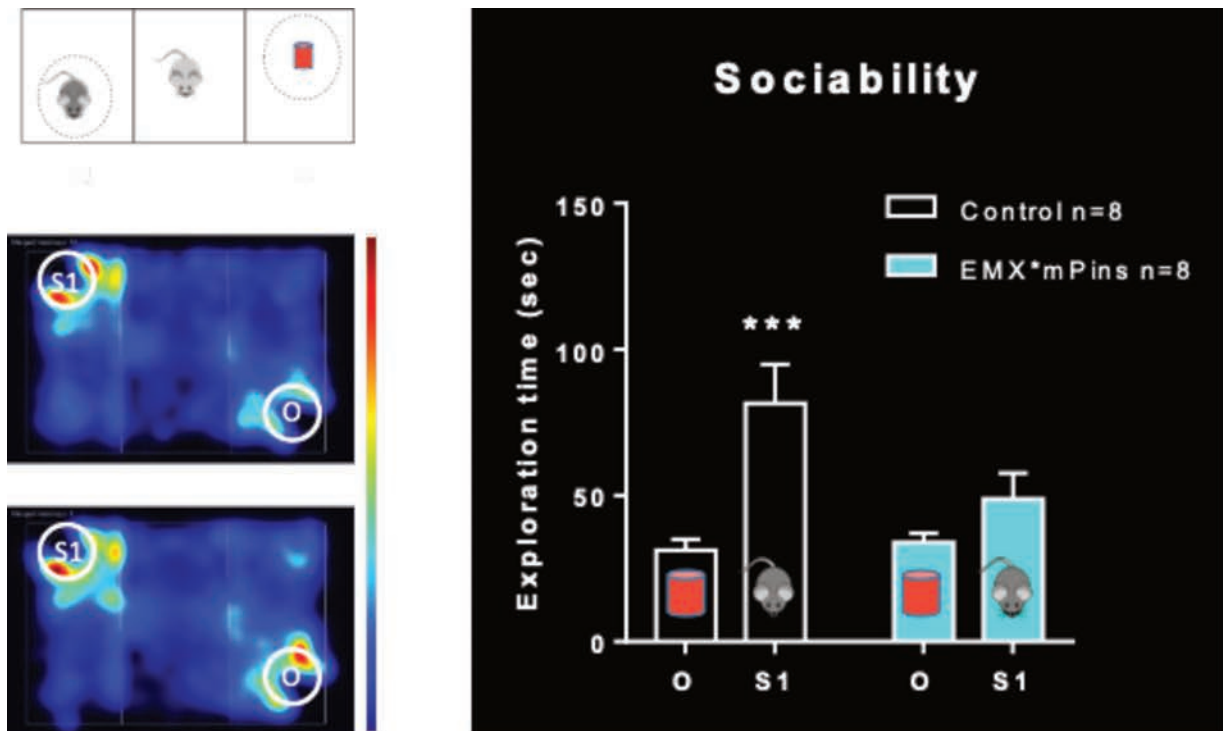


Figure 36 : La mutation de *Gpsm2* semble conduire à des troubles de la sociabilité. Le test de la boîte à trois compartiments suggère un déficit de sociabilité chez les souris *Gpsm2^{Emx1}* par rapport aux souris contrôles. Les souris *Gpsm2^{Emx1}* montrent le même intérêt pour l'objet que pour une souris. Le code couleur représente en bleu un temps d'exploration faible de la souris alors qu'à l'inverse un temps d'exploration important est représenté en rouge. S1 : Souris ; O : objet.

Bases moléculaires de la physiopathologie de la voie de signalisation de la polarité planaire dépendante des protéines Gi

La perte auditive est le trouble sensoriel le plus commun avec 40% des personnes de plus de 65 ans affectées, entraînant, chez ces patients une dégradation de leur qualité de vie et un isolement sociale. Les principales causes sont le vieillissement ou l'exposition au bruit, mais les mutations génétiques sont aussi à l'origine de déficits auditifs. Parmi ces surdités, le Syndrome de Chudley McCullough (CMCS) est une maladie rare caractérisée par une surdité sévère et précoce associée à des anomalies cérébrales (Chudley et al., 1997). Récemment, des mutations du gène *GPSM2* (G protein signaling modulator 2) ont été décrites comme étant responsables de cette pathologie sans que l'on en connaisse les mécanismes (Walsh et al., 2010). A l'aide d'un modèle d'étude murin de cette pathologie, nous avons identifié les bases moléculaires de la pathologie ainsi qu'une nouvelle fonction moléculaire pour *Gpsm2* sur la modulation du cytosquelette d'actine. La perturbation de cette fonction affecte à la fois la maturation des cellules auditives et la croissance des jeunes neurones, pouvant expliquer les surdités et l'hypoplasie du corps calleux décrits chez ces patients (Mauriac et al., 2017). De plus, nous avons identifié les partenaires de *Gpsm2*, les protéines *Gai*, comme indispensables à la fonction auditive (Beer-Hammer et al., 2018). Au niveau moléculaire, nous avons découvert une nouvelle interaction de *Gpsm2* avec une protéine essentielle à la maturation des cellules auditives et impliquées dans les surdités de type Usher, la Whirlin.

Par conséquent, notre étude a permis de clarifier l'étiologie du CMCS et de montrer que sa complexité et son aspect multisyndromique sont dus au rôle multifonctionnel du complexe *Gpsm2/Gai* non seulement sur la dynamique de la tubuline dans des cellules en prolifération et en post-mitotiques (Ezan et al., 2013), mais aussi sur la dynamique d'actine (Mauriac et al., 2017).

Mots clés : Polarité, *Gpsm2*, Cytosquelette, pathologie rare, cochlée, corps calleux.

Molecular basis of the physiopathology of the planar cell polarity signaling pathway depending on Gi proteins

Hearing loss is the most common sensory disorder, affecting 40% of people over 65 years old, leading for these patients, to the deterioration of their quality of life and to their social isolation. The main causes are aging or exposure to noise. However, many genes can also cause deafness. Among these deafnesses, the Chudley McCullough Syndrome (CMCS) is a rare disease characterized by severe and early deafness associated with brain abnormalities (Chudley et al., 1997). Recently, mutations in the *GPSM2* (G protein signaling modulator 2) gene were found to be causative of this pathology, but the molecular basis were unknown (Walsh et al., 2010). Using a murine model of this pathology, we identified the molecular basis of this pathology as well as a new molecular function for *Gpsm2* on the modulation of actin cytoskeleton. The disruption of this function leads to defect of the maturation of auditory hair cells and the reduction of the outgrowth of young neurons which may explain the deafness and the hypoplasia of the corpus callosum described in these patients (Mauriac et al., 2017). In addition, we identified partners of *Gpsm2*, *Gai* proteins, as essential for auditory function (Beer-Hammer et al., 2018). At the molecular level, we have discovered a new interaction of *Gpsm2* with a protein essential for the maturation of auditory cells and involved in Usher type deafness, Whirlin.

Therefore, our study clarified the etiology of CMCS and show that the complexity and multisyndromic aspect of this pathology is due to the multifunctional role of the complex *Gpsm2/Gai* not only on tubulin dynamics in proliferating cells and post-mitotic cells (Ezan et al., 2013), but also on actin dynamics (Mauriac et al., 2017).

Keywords : Polarity, *Gpsm2*, cytoskeleton, rare disease, cochlea, corpus callosum.

Neurocentre Magendie – U1215

Équipe Polarité Planaire et Plasticité - 146 rue Léo Saignat 33077 Bordeaux Cedex