



**HAL**  
open science

# Rôle de la chaîne légère de la ferritine dans le codage sonore

Chloe Petit

► **To cite this version:**

Chloe Petit. Rôle de la chaîne légère de la ferritine dans le codage sonore. Neurosciences. Université de Montpellier, 2022. Français. NNT : 2022UMONT056 . tel-04087075

**HAL Id: tel-04087075**

**<https://theses.hal.science/tel-04087075v1>**

Submitted on 2 May 2023

**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 POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En neurosciences

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques de Montpellier

Unité de recherche INSERM U1298 – Institut des Neurosciences de Montpellier

## Rôle de la chaîne légère de la ferritine dans le codage sonore

Présentée par Chloé PETIT

Le 19 octobre 2022

Sous la direction de Régis NOUVIAN

Devant le jury composé de

Mireille MONTCOUQUIOL, Directrice de recherche INSERM, Université de Bordeaux

Nicolas MICHALSKI, Chargé de recherche, Institut Pasteur de Paris

Paul AVAN, Professeur des universités, Université Clermont Auvergne

Emmanuel VALJENT, Directeur de recherche INSERM, Université de Montpellier

Jean-Luc PUEL, Professeur des universités, Université de Montpellier

Régis NOUVIAN, Directeur de recherche CNRS, Université de Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Président du Jury

Examineur

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



*Lorsque j'étais en Master 2, j'ai rencontré un doctorant à Paris, il était à quelques mois de la fin de sa thèse. Un jour il m'a expliqué que la thèse, c'était comme un marathon : c'est une course dans laquelle il faut donner un coup de starter mais surtout tenir sur la longueur. En première année de thèse, un soir vers 20h30 au confocal, Philippe m'a dit : « Chloé, n'en doute pas, tu es mariée à ta thèse. Tu dors avec elle, tu manges avec elle, tu passes tout ton temps avec elle, tu l'aimeras la majorité du temps, elle t'énervera voire tu la détesteras certains jours, mais toujours tu reviendras vers elle. Car tu es mariée à ta thèse ». Chers lecteurs sachez-le donc : la thèse c'est comme si vous courriez un marathon en tenue de mariage.*

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury : le **Dr Mireille Montcouquiol** et le **Dr Nicolas Michalski** pour avoir accepté de lire et d'expertiser mon travail de thèse, le **Dr Emmanuel Valjent**, le **Pr Paul Avan** et le **Pr Jean-Luc Puel** pour avoir accepté d'être examinateurs dans ce jury de thèse.

Je tiens à remercier vivement **Jean-Luc Puel** pour m'avoir suivie tout au long de ces années et m'avoir accueillie dans son laboratoire chaleureux et dynamique durant ma thèse. Merci pour votre bienveillance et vos encouragements.

**Jérôme, Jean-Charles, Jing**, merci pour votre soutien tout au long de ces trois années. Jérôme, tes pouces levés associés à ton sourire immense me donnaient à chaque fois la patate pour le restant de la journée. Jean-Charles, merci pour ta présence, et surtout un immense merci pour m'avoir offert l'opportunité d'encadrer des TP à l'école d'audioprothèse, c'est une expérience inoubliable (que j'ai bien l'intention de réitérer !). Jing, ta douceur, ton rire, associés à ton analyse critique, ont toujours été pour moi une source d'inspiration, merci. **Florence**, merci pour ton aide et ton soutien au cours de ces trois années.

Merci à **Marielle Sicard**, pour m'avoir encadrée lors de mon cursus d'audioprothèse et m'avoir encouragée au cours du master, puis de la thèse. Même si toi comme moi, on n'aurait jamais cru il y a quelques années en arrière que je partirai si loin dans les études, eh bien c'est finalement chose faite !

**Régis**, merci. Ce mot est trop court et trop simple pour décrire tout ce que tu m'as apporté au fil de ces années. Même avec la majuscule, Merci, ça ne suffira pas, je crois bien, pour appuyer sur le fait que tu as su être présent à chaque instant, pour m'aider, m'encourager, me pousser à me surpasser, prendre du recul, recommencer, réfléchir, arrêter de réfléchir et foncer. Et cela à n'importe quelle heure du jour et de la nuit. Travailler à tes côtés aura été un enrichissement professionnel et personnel énorme. Merci de m'avoir offert l'opportunité de vivre cette thèse.

Merci aux différents stagiaires que j'ai pu croiser au cours de cette thèse : **Vincent F.**, sans qui je n'aurais jamais pu installer Matlab sur mon ordi perso durant le 1<sup>er</sup> confinement. **Romain V.** et sa naïveté de jeune stagiaire (ça me manque). **Victor L.** pour nos discussions d'adultes. **Raphaël N.** pour ta jeunesse et m'avoir rappelé que la curiosité sans limite, ça existe. **Elisa**, pour ton *poker face* même en situation de crise. **Valentiine**, un grand merci, pour toute ta contribution durant tes quatre mois de stage avec nous. Tu as été une étincelle dans cette fin de thèse, une lueur enrichissante d'un point de vue personnel et professionnel. Je n'oublierai pas ton regard affolé quand tu as fait sauter les plombs en salle de patch, ni ton sourire lorsque tu as eu terminé tes analyses sur Igor. Alors merci à vous les stagiaires, car vous avez tous apporté indirectement votre petite touche personnelle à cette thèse.

Merci à tous les ORL qui ont cheminé dans l'INM : **Ashley, Anne-Lise, Fabian**, qui m'ont fait découvrir la vie d'un interne en ORL et leur curiosité en tant que médecin sur l'aspect recherche. Ashley, je pense à toi à chacune de mes infusions où il y a du fenouil.

Merci aux autres doctorants et jeunes docteurs qui ont croisé ma route avant et pendant (et sûrement après) : **Gaby** (ma Docteur préférée), **Carolanne, Alecksandra, Roxane, Laetitia, Yuvraj, Philippe, Julian, Arthur, Nadège, Léna, Alison, Alyssa, Anaïs, Edson, Jérôme, Richard, Léonore, Sandra**.

**Alicia, Jason, Dorine, Tania**, pas en doctorat certes mais toujours présents pour un bon conseil et une bonne soirée ! Merci pour votre présence et votre soutien.

**Corentin**, un immense merci pour avoir été pour moi dans l'équipe un post-doc plus qu'un doc sur lequel on pouvait compter à chaque instant. Même au-delà de l'Atlantique. Tu m'as appris une montagne de choses durant ces deux premières années de thèse, et pour cela je t'en suis énormément reconnaissante. La quantité de thé que tu peux boire en une seule journée restera également gravé dans ma mémoire à jamais, sache-le.

Merci à tous les doctorants de mon équipe : **Adrien**, sans toi les statistiques n'auraient pas eu la même couleur. **Paul**, ton poil dans la main me fera sourire jusqu'à la tombe, c'est certain. **Jamal**, tes réponses Oui/Non étaient toujours sans équivoque, merci. **Mélissa**, la princesse aux kiwis biologiques, ta persévérance et ta volonté m'impressionneront toujours. **Rym**, tes jurons en français et notre soutien commun dans les manip resteront gravés dans ma mémoire. **Daniil**, dernier doctorant arrivé dans la course, je te souhaite le meilleur pour la suite, avec ta culture, tes connaissances scientifiques et ton humour, tu iras loin !

**Artem**, merci pour ta gentillesse sans limites, ton humour, et ton violon. Tu es un jeune chercheur en or. Tes connaissances scientifiques, ton raisonnement et ta pertinence continueront à m'inspirer au cours de ma vie professionnelle.

Merci à **Blandine**, une lumière dans l'institut, avec qui le sourire et le rire étaient présents à chacune de nos rencontres, même au détour de nos problèmes administratifs. L'heureux évènement que tu attends me remplit d'une joie immense, j'ai hâte de la rencontrer et lui dire à quel point tu es une jeune femme géniale.

Merci au personnel de l'animalerie, *big up* à **Flora**, **Chris** et **Kévin** ! **Marie-Line** je te souhaite une très belle future retraite. **Antoine P.**, merci pour ton aide dans mes manip, pour anibio, toujours avec le sourire et une immense gentillesse.

**Chantal C.** merci mille fois pour toute l'aide que tu m'as apportée pour la microscopie électronique. Merci d'avoir pris le temps de m'apprendre à faire les approches, de m'expliquer comment utiliser ces magnifiques machines que sont le TEM et le SEM. Sans compter les sublimes thés que tu m'as fait goûter, merci ! Un immense merci à vous aussi **Rémy P.**, pour tout ce que vous m'avez appris au cours de nos séances de TEM, toujours avec le sourire et une gentillesse sans bornes. La connaissance n'a pas de limites, elle est comme un ciel étoilé. J'ai découvert avec vous que j'en avais touchée du bout des doigts qu'une minuscule parcelle...mais que j'avais aussi toute une vie pour la découvrir si ma curiosité continue d'exister. Alors vivement de découvrir le reste !

**Philippe**, pour toutes nos petites et grandes conversations qui prenaient tous leurs sens au fil de nos déjeuners et sorties. Tu es mon musicien scientifique préféré.

**Julian**, pour ta gentillesse, ton humour trash, ta musique et ta présence tout simplement. Merci !

**Pauline C.**, **Simon D.**, mes post-docs préférés, merci d'avoir été présents sur le début de ma thèse. J'espère que la Belgique vous réussit.

Merci à **Tino** et **Dono**, sans qui cette thèse n'aurait définitivement pas eu la même saveur. Vous m'avez apporté la pluie et le soleil (mais surtout beaucoup de soleil) au cours de ces trois ans et je vous en serai éternellement reconnaissante. Ma vie a pris un nouveau sens à vos côtés. Soleil du Triolet, Thérapie taxi, vous m'avez fait vivre un arc-en-ciel de sentiments et d'évènements. Merci !

Merci à tous ceux qui n'étaient pas au labo mais qui m'ont tellement soutenue dans cette épreuve : **Margot et Mathilde**, vous avez été là du début (emménagement à Montpellier) à la fin (vous viendrez à mon déménagement n'est-ce pas ?), merci pour TOUT. Si je tiens debout

c'est grâce à vous. **Paul**, je suis tellement heureuse de t'avoir rencontré. Connaître un mec qui se pose autant de questions que moi par minute, voire plus, c'est peu dire si c'est rare ! Merci pour nos courses à pied du dimanche matin, les soirées repas, les randos, etc. PS : bisou à Noé (PSS : tu noteras l'absence de S à bisou).

**Marjorie**, tu es mon pilier sur cette terre, on en a vécu des choses toutes les deux, des doutes, des certitudes, des fou-rires, des pleurs, des rêves, des réalités... Notre amitié a poussé tout doucement ces dernières années, pour devenir une structure inébranlable que nous sommes fières d'avoir co-construite. Ton soutien indéfectible dans tous mes choix, personnels et professionnels, me feront presque dire que tu es la femme de ma vie ! Merci d'être toi Marjo.

**Pauline Millet**, présente à chaque instant, ta réalité des choses m'aura fait avancer un nombre incalculable de fois. Merci. Tu as aussi vécu un revirement professionnel pendant mes 3 ans de thèse, et je suis fière que l'on se soit soutenues l'une et l'autre dans nos aventures ! Bon sang de bonsoir on l'a fait Pauline !

**Manon, Flore, Pauline**, notre quatuor qui fête bientôt ses 20 ans me donne des frissons... Vous avez été là à chacune des étapes de ma vie, cette thèse est une étape de plus que je passe à vos côtés, merci d'être présentes. Vous avez été d'un soutien comme jamais sur la fin. Je veux nous retrouver toutes les 4 en coloc à la retraite.

A tous mes amis/amies, sans qui la vie n'aurait pas de sens : **Antoine B., Charlotte, Allison, Cyrielle, Guillaume, Delphine, Max, Kristina, Lory, Sarah F., Sarah F., Eva M., Pierre Q., Razane, Romane, Jérémy, Nicole, Myriam, Marie R., Virginie**, merci.

**Jonathan**, tu es arrivé dans ma vie à un moment où je ne m'y attendais absolument pas. Tu regardes le ciel comme je regarde la terre, et je crois que c'est le mélange des deux qui nous unit. Merci pour ton soutien malgré mon manque de temps, car ces derniers mois auront été intenses.

Merci à l'ensemble de **ma famille**, grands-parents, oncles, tantes, cousin, cousines, pour votre présence, vos sourires et vos terribles « et sinon ta thèse, tu en es où ? » dont la réponse est écrite ci-après dans le manuscrit.

Merci à ma sœur, **Roxane**, mon Tournesol pour la vie. Ton cœur se tournera toujours vers le soleil même si parfois il est compliqué à trouver. Merci d'avoir su être là, quand ça allait et aussi quand ça n'allait pas. Tu sais toujours pertinemment me mettre sur la piste (même si je ne suis pas toujours d'accord).

**Matyssou** d'amour, mon neveu, merci d'être là. Chaque fois que je te vois tu me rappelles à quel point la vie c'est un ciel bleu où les nuages apparaissent et disparaissent au fil de notre humeur et de rien d'autre...

Enfin, merci à **mes parents** qui m'ont soutenue au fil de ces 3 ans, et même si parfois mon sujet de thèse vous paraissait bien flou, vous êtes restés convaincus que j'apporterai ma pierre à l'édifice. Grâce à votre amour indéfectible, c'est chose faite.

Merci aux petites souris des différentes lignées avec lesquelles j'ai travaillé : FTL1, A211V, Otof, FTH. Grâce à vous la science avance et permettra de faire que les maladies auditives soient mieux traitées dans un futur que j'espère proche.

## Résumé

### Rôle de la chaîne légère de la ferritine dans le codage sonore

La cochlée est l'organe de l'audition. Elle contient deux grands types de cellules sensorielles auditives, les cellules ciliées externes (CCE) qui amplifient les ondes sonores et sont responsables de la sélectivité en fréquence ; et les cellules ciliées internes (CCI) qui activent les fibres du nerf auditif à partir de la libération de leur neuromédiateur, le glutamate, à la fente synaptique. Pour assurer leurs rôles respectifs, les cellules ciliées sont coiffées par un faisceau de stéréocils qui détecte l'onde sonore. Les mécanismes nécessaires au maintien de l'activité des cellules ciliées restent en grande partie indéterminés. Ici, nous avons étudié le rôle de la ferritine, connue pour stocker le fer intracellulaire et prévenir ainsi la formation de radicaux hydroxyles, dans le codage de l'information sonore. Pour cela, nous avons examiné le phénotype des souris dont le gène codant la chaîne légère de la ferritine (FTL1) a été invalidé par recombinaison homologue. La mesure des potentiels évoqués auditifs montre des seuils auditifs similaires chez les souris de type sauvage et hétérozygote. En revanche, chez la souris homozygote knock-out, 20 % de la population présente une élévation des seuils auditifs, associée à une diminution des produits de distorsions des émissions oto-acoustiques, reflétant une baisse d'activité des CCE. En accord avec ces données fonctionnelles, l'observation morphologique des cochlées en microscopie électronique montre une dégénérescence des CCE et une altération des stéréocils des CCI. Bien que la perte de FTL1 n'ait pas modifié le nombre et la taille des rubans synaptiques des cellules ciliées, les mesures effectuées en patch-clamp montrent une plus grande proportion de CCI avec un courant calcique altéré chez les souris FTL1<sup>-/-</sup>. Ces résultats suggèrent que le maintien des cellules ciliées est tributaire de la ferritine. Cette dernière pourrait jouer un rôle dans la protection des cellules ciliées contre la formation de radicaux libres.

**Mots clés** : cochlée ; cellule ciliée ; ferritine ; surdité

## Abstract

### Role of the ferritin light chain in the sound coding

Hearing relies on two major kind of sensory auditory hair cells in the cochlea: the outer hair cells (OHCs), which amplify sound stimulation, and the inner hair cells (IHCs), which transduce sound stimulation into release of neurotransmitter. Thus, cochlear activity sets high demands on the cellular metabolism. Ferritin, which belongs to the iron-binding protein family, stores the intracellular iron, require for several metabolic processes. Here, we probed the role of ferritin in the cochlea by phenotyping the ferritin light-chain subunit knock-out mouse. Wild-type and heterozygous mice showed similar ABR and auditory thresholds. In contrast, in the FTL1 knock-out mouse, we found-out a threshold shift in 20% of the homozygous mice associated with the loss of the distortion product of otoacoustic emissions, reflecting the OHC's activity. Consistently, light and electron microscopy show a massive degeneration of the OHCs. In addition, we found-out splayed hair bundle in IHCs in the fraction of FTL1<sup>-/-</sup> with threshold shift. Although the loss of FTL1 did not change the number and size of the hair cell synaptic ribbons, we found-out a larger proportion of hair cells with altered calcium current in the FTL1<sup>-/-</sup> mice. We propose that ferritin may protect to some extent the hair cells and notably the ribbon synapse against iron-induced hydroxyl radicals.

**Key words**: cochlea; hair cells; ferritin; deafness



# Table des matières

Abréviations .....	10
Liste des Figures et des Tableaux .....	12
1 INTRODUCTION.....	13
2 LOGIQUE DU CODAGE DE L'INFORMATION SONORE .....	16
2.1 L'oreille.....	17
2.1.1 L'oreille externe.....	19
2.1.2 L'oreille moyenne .....	19
2.1.3 L'oreille interne.....	21
2.2 La cochlée .....	21
2.2.1 Les fluides cochléaires.....	23
2.2.2 L'organe de Corti.....	26
2.2.3 Mécanotransduction des cellules ciliées.....	27
2.2.4 Mécanotransduction et potentiel de récepteur des cellules ciliées externes .....	32
2.2.5 Electromotilité des cellules ciliées externes.....	33
2.2.6 Mécanotransduction et potentiel de récepteur des cellules ciliées internes .....	34
2.2.7 La synapse à ruban des cellules ciliées internes.....	36
2.3 Codage en fréquence .....	39
2.3.1 La tonotopie .....	39
2.3.2 Mécanismes actifs et cellules ciliées externes .....	41
2.3.3 Le verrouillage en phase .....	41
2.4 Codage en intensité.....	43
2.4.1 Anatomie et fonction de l'innervation des cellules ciliées internes .....	43
2.4.2 Anatomie et fonction de l'innervation des cellules ciliées externes .....	47
2.5 La voie auditive ascendante.....	48
3 LA FERRITINE.....	49
3.1 Composition et rôle de la ferritine.....	50
3.2 Régulation de l'expression de la ferritine.....	53
3.3 Maladies et mutations génétiques liées à la ferritine.....	54
3.4 Mécanisme de mort cellulaire : la Ferroptose .....	55
3.5 Mécanismes moléculaires de l'homéostasie du fer.....	57
4 MATERIEL ET METHODES .....	60
4.1 Animaux.....	61
4.2 Génotypage.....	62
4.3 Exploration fonctionnelle .....	63

4.3.1	Anesthésie des animaux.....	63
4.3.2	Potentiels évoqués auditifs .....	64
4.3.3	Produits de distorsion des émissions oto-acoustiques.....	65
4.3.4	Mesure du potentiel endocochléaire.....	65
4.3.5	Patch-clamp.....	66
4.4	Observations anatomiques : Microscopie photonique .....	68
4.4.1	Immunofluorescence .....	68
4.4.2	Microscopie confocale .....	70
4.4.3	Microscopie STED .....	70
4.5	Observations anatomiques : Microscopie Electronique.....	71
4.5.1	Microscopie électronique à balayage .....	71
4.5.2	Microscopie électronique à transmission .....	72
5	RESULTATS.....	74
5.1	Exploration fonctionnelle des souris FTL1 <sup>-/-</sup> .....	75
5.1.1	Atteinte auditive dans une fraction de souris FTL1 <sup>-/-</sup> .....	75
5.1.2	Etude longitudinale de la perte auditive chez les souris FTL1 <sup>-/-</sup> .....	79
5.2	Etude morphologique du phénotype de la souris FTL1 <sup>-/-</sup> .....	82
5.2.1	Atteinte de l'épithélium sensoriel chez les souris FTL1 <sup>-/-</sup> HT.....	82
5.2.2	Morphologie et activité de la strie vasculaire chez les souris FTL1 <sup>-/-</sup> HT.....	84
5.2.3	Altération du pôle apical des cellules ciliées de souris FTL1 <sup>-/-</sup> HT.....	85
5.2.4	Nombre et dimension des rubans synaptiques.....	89
5.3	Modulation de l'amplitude des courants calciques par la ferritine .....	93
6	DISCUSSION .....	95
6.1	Atteinte des cellules ciliées chez les souris homozygotes FTL1 <sup>-/-</sup> HT.....	96
6.2	La dégénérescence des cellules ciliées reflète-t-elle une ferroptose cochléaire ?.....	98
6.3	Variabilité du phénotype chez les souris homozygotes FTL1 <sup>-/-</sup> .....	100
6.4	FTL1, une protéine à proximité des rubans ? .....	101
7	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	103
	Résumé.....	125

# Abréviation

$\tau$	Constante de temps membranaire
<b>4-AP</b>	4-aminopyridine
<b>AC</b>	Composante alternative (du potentiel récepteur)
<b>ATPases N<sup>+</sup>/K<sup>+</sup></b>	Pompe sodium-potassium
<b>BAPTA</b>	Acide aminopolycarboxylique spécifique au calcium (chélateur calcique)
<b>BK</b>	Canaux potassiques de grande conductance sensible au calcium
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Chlorure de calcium
<b>Cav</b>	Canal calcique voltage-dépendant
<b>CCE</b>	Cellules ciliées externes
<b>CCI</b>	Cellules ciliées internes
<b>CDH23</b>	Cadhérine 23
<b>CIB2</b>	Calcium- and Integrin-Binding Protein 2
<b>CIC</b>	Canaux chlorure
<b>CsCl</b>	Chlorure de césium
<b>CsOH</b>	Hydroxyde de césium
<b>CtBP2</b>	C-terminal binding protein 2
<b>dB</b>	Décibel
<b>DC</b>	Composante continue (du potentiel récepteur)
<b>DMT1</b>	Transporteur de métal divalent 1
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétra-acétique
<b>ETOH</b>	Ethanol
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	Fer ferreux
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Fer ferrique
<b>FM1-43</b>	N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(4-(Dibutylamino) Styryl) Pyridinium
<b>FTL1</b>	Chaîne légère de la ferritine
<b>FTL1<sup>-/-</sup></b>	Souris knock-out de la chaîne légère de la ferritine
<b>FTL1<sup>+/+</sup></b>	Souris sauvage, contrôle de la FTL1 <sup>-/-</sup>
<b>FTL1<sup>+/-</sup></b>	Souris hétérozygote pour la chaîne légère de la ferritine
<b>FTL1<sup>-/-</sup> LT</b>	Souris knock-out de la chaîne légère de la ferritine « Low Thresholds »
<b>FTL1<sup>-/-</sup> HT</b>	Souris knock-out de la chaîne légère de la ferritine « High Thresholds »
<b>FTH</b>	Chaîne lourde de la ferritine
<b>GPX4</b>	Enzyme - glutathion peroxydase 4
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>HEPES</b>	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxide d'hydrogène
<b>HF</b>	Neuroferritinopathie
<b>Hz</b>	Hertz, unité de fréquence
<b>IRE</b>	Elément de réponse au fer - <i>iron responsive element</i>
<b>IRP1, IRP2</b>	Protéine régulatrice de l'expression de ferritine 1 et 2
<b>Ix</b>	Courant X
<b>KCl</b>	Chlorure de potassium
<b>KCNE1</b>	Canal potassique voltage-dépendant
<b>KCNQ1</b>	Canal potassique voltage-dépendant
<b>KV7.4</b>	Canal potassique voltage-dépendant, codé par le gène <i>KCNQ4</i>
<b>LHFPL5</b>	pour LHFPL Tetraspan Subfamily Member 5
<b>Mg-ATP</b>	Magnésium adénosine triphosphate
<b>MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O</b>	Magnésium chloride hexahydrate
<b>MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O</b>	Magnésium sulfate heptahydrate
<b>MtF</b>	ferritine mitochondriale
<b>MTP1</b>	Ferroportine

<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium
<b>Na-GTP</b>	Sodium guanosine triphosphate
<b>NaOH</b>	Hydroxide de sodium
<b>NKCC</b>	Cotransporteur (Na-K-Cl) du sodium, potassium et chlorure
<b>OH<sup>-</sup></b>	Anion hydroxyde
<b>OH·</b>	Radical hydroxyle
<b>PA</b>	Potentiels d'action
<b>pb</b>	Paires de bases
<b>PCDH15</b>	Protocadherin15
<b>PDEOA</b>	Produits de distorsions des émissions oto-acoustiques
<b>PEA</b>	Potentiels évoqués auditifs
<b>PCR</b>	Réaction de Polymérisation en Chaîne
<b>PX</b>	<i>Xeme</i> jour post-natal
<b>ROS</b>	éléments réactifs à l'oxygène - <i>Reactive oxygen species</i>
<b>RRP</b>	Readily Releasable Pool
<b>SGN</b>	Neurones du ganglion spiral
<b>SNAREs</b>	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
<b>SNAP25</b>	Synaptosomal-associated protein 25
<b>SRP</b>	Slowly Releasable Pool
<b>TEA</b>	Tétraéthylammonium
<b>TEA-Cl</b>	Chlorure de tétraéthylammonium
<b>TfR1</b>	Récepteur membranaire de la transferrine
<b>TMC (1, 2)</b>	Membres de la famille des TMC (transmembrane channel-like)
<b>TMHS</b>	Tetraspan membrane protein of hair cell stereocilia
<b>TMIE</b>	Transmembrane inner ear
<b>VGLUTX</b>	Transporteur vésiculaire du glutamate de sous-type X
<b>VAMP1/2</b>	Vesicle-Associated Membrane Protein
<b>ZA</b>	Zone active

# Liste des Figures et Tableaux

Figure 2.1: système auditif périphérique .....	18
Figure 2.2 : La spirale cochléaire .....	22
Figure 2.3 : Section axiale de la cochlée .....	23
Figure 2.4 : Schéma d'une coupe transversale la cochlée. ....	24
Figure 2.5 : Schéma représentant les cellules de la strie vasculaire.....	25
Figure 2.6 : Section transversale d'un tour de spire de la cochlée. ....	26
Figure 2.7 : Principaux constituants des stéréocils et de la plaque cuticulaire.....	27
Figure 2.8 : Représentation schématique des cellules ciliées .....	31
Figure 2.9 : Stéréocils des cellules ciliées auditives chez la souris en microscopie électronique à transmission. ....	31
Figure 2.10 : Variations tonotopiques des propriétés biophysiques de la CCE. ....	33
Figure 2.11 : Composition moléculaire des synapses à rubans.....	38
Figure 2.12 : Amplification de la cochlée. ....	40
Figure 2.13 : Verrouillage en phase des fibres du nerf auditif. ....	42
Figure 2.14 : Codage de l'intensité sonore.....	43
Figure 2.15 : Hétérogénéité des synapses à rubans et conséquences physiologiques. ....	46
Figure 3.1 : Structure de la ferritine .....	52
Figure 3.2 : Processus biologique de la ferroptose.....	56
Figure 4.1: Exemple du résultat de génotypage du 04.01.2021.....	63
Figure 5.1 : Exploration fonctionnelle de l'audition chez les souris FTL1 <sup>-/-</sup> .....	76
Figure 5.2 : Atteinte auditive chez les souris FTL1 <sup>-/-</sup> .....	78
Figure 5.3 : Diminution des produits de distorsions des émissions otoacoustiques (PDEOAs) chez les souris FTL1 <sup>-/-</sup> âgées de 15 jours. ....	80
Figure 5.4 : Les souris FTL1 <sup>-/-</sup> LT ne développent pas d'atteinte auditive progressive. ....	81
Figure 5.5 : Coupe transversale du tour médian de cochlées issues de la lignée FTL1. ....	83
Figure 5.6 : Morphologie et activité de la strie vasculaire. ....	85
Figure 5.7 : Observation des cellules sensorielles en microscopie électronique à transmission. ....	86
Figure 5.8 : Défauts morphologiques des cellules sensorielles chez les souris FTL1 <sup>-/-</sup> HT. ....	89
Figure 5.9 : Comptage des rubans et synapses à rubans des cellules ciliées internes. ....	90
Figure 5.10 : Rubans synaptiques en microscopie super-résolutive. ....	92
Figure 5.11 : Modulation des courants calciques des CCI par FTL1. ....	94
Tableau 4.1 : Etapes de la Réaction de Polymérisation en Chaîne dans le cadre du génotypage de la lignée murine FTL1.....	62
Tableau 4.2 : Liste des anticorps utilisés pour les marquages immunofluorescents des explants de cochlées.....	69
Tableau 4.3 : Liste des anticorps secondaires utilisés pour les marquages immunofluorescents des explants de cochlées.....	69

# 1 . INTRODUCTION

La cochlée, l'organe périphérique de l'audition, transforme l'onde acoustique vibratoire en un message nerveux, interprétable par le cerveau. La cochlée est non seulement capable de suivre les stimulations sonores en verrouillage de phase jusqu'à 1 à 2 kHz mais aussi de coder des fréquences aiguës, jusqu'à 20 kHz chez l'homme, et jusqu'à 100 kHz chez certaines chauves-souris et baleines (Fettiplace, 2020). De plus, la cochlée assure le codage des stimulations acoustiques sur une dynamique d'environ 120 dB. Pour ce faire, la cochlée met en jeu deux contingents de cellules sensorielles : les cellules ciliées externes (CCE) et les cellules ciliées internes (CCI). Morphologiquement, les cellules ciliées sont des cellules polarisées avec au pôle apical un faisceau de stéréocils, siège de la mécanotransduction, c'est-à-dire la transformation des ondes sonores en potentiel de récepteur (Fettiplace, 2017), et à leur pôle basolatéral des synapses à ruban, à savoir des organites spécialisés dans l'exocytose du neurotransmetteur (Moser *et al.*, 2019). Cependant, le rôle de ces deux populations diffère dans la cochlée. Grâce à leurs propriétés électromotiles, les CCE assurent l'amplification des ondes sonores et augmentent la sélectivité en fréquence au sein de la cochlée (Bavi *et al.*, 2021). En raison de la nature de l'innervation des cellules, c'est-dire 90 à 95% des fibres du nerf auditif projetant sur les CCI, ce sont ces dernières qui transforment les ondes sonores en un message nerveux, qui prend naissance avec l'activation des fibres du nerf auditif (Özçete and Moser, 2020).

En 2014, un crible en double hybride réalisé au sein de notre équipe a identifié la chaîne légère de la ferritine comme partenaire d'interaction de RIBEYE, le composant majeur des synapses à ruban (Mahaman Bachir Dodo, Sahia. Identification de nouvelles protéines des synapses à ruban. Montpellier : 2014. Université de Montpellier 1 : thèse de doctorat, Biologie Santé). Ce résultat était surprenant dans la mesure où la ferritine n'est pas une protéine synaptique mais a pour rôle de stocker le fer intracellulaire. Aussi, il était important d'étudier plus en détail la fonction de la ferritine dans la cochlée pour valider les données en double

hybride. Pour ce faire, nous avons étudié le phénotype de la souris dont le gène codant la chaîne légère de la ferritine (FTL1) a été invalidé par recombinaison homologue (Li *et al.*, 2015). Ces souris ne présentaient pas d'atteintes majeures, probablement en raison d'une compensation par la chaîne lourde de la ferritine (FTH), dotée d'une activité ferroxidase. Cependant les auteurs notaient un trouble de l'équilibre chez une fraction des souris FTL1<sup>-/-</sup>, suggérant une atteinte de l'oreille interne (Li *et al.*, 2015). Nos résultats montrent que la perte de la chaîne légère de la ferritine entraîne une élévation des seuils auditifs dans une fraction de souris homozygotes, associée à la dégénérescence des cellules ciliées et à une réduction de l'amplitude des courants calciques des cellules ciliées internes. Ces résultats suggèrent un rôle protecteur de la ferritine contre la formation de radicaux libres à partir du fer intracellulaire. L'interaction de la ferritine avec les rubans synaptiques pourrait alors refléter une protection locale des synapses à ruban contre le stress oxydatif.

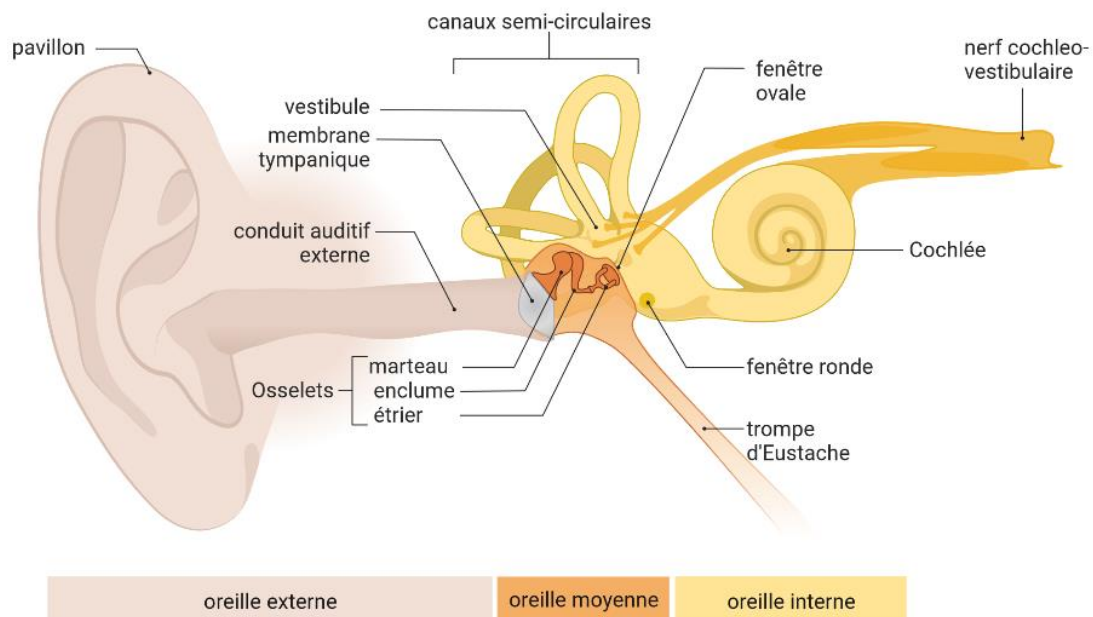


## 2 . LOGIQUE DU CODAGE DE L'INFORMATION SONORE

Une stimulation acoustique est une onde de pression définie par une fréquence et une intensité. La fréquence représente le nombre de vibrations par seconde. Elle est mesurée en Hertz (Hz) et définit la hauteur des sons, aigus ou graves. Ainsi, les courtes périodes (inverse de la fréquence) caractérisent les sons aigus de hautes fréquences et inversement, les périodes plus longues caractérisent les sons graves de basses fréquences. L'amplitude de la vibration correspond à l'intensité du son, qui définit les sons forts ou faibles. L'intensité est mesurée en décibel (dB). Il existe plusieurs unités de décibel. La plus couramment utilisée appliquée est le dB SPL, pour dB *Sound Pressure Level*, qui est basé sur la plus petite pression d'air ( $2,0 \cdot 10^{-5}$  Pa) procurant une sensation auditive chez l'homme à 1 kHz.

## 2.1 L'oreille

L'oreille se décompose en trois grandes parties : l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne. Chacune joue un rôle crucial dans la conduction du message sonore jusqu'au cortex auditif. L'oreille externe se compose du pavillon et du conduit auditif, et a pour fonction de capter les sons. L'oreille moyenne comprend le tympan et les trois osselets (marteau, enclume, étrier) et adapte l'impédance entre le milieu aérien et liquidien. Enfin, l'oreille interne est constituée de deux organes : le vestibule, organe sensoriel de l'équilibre, et la cochlée, organe périphérique de l'audition qui assure la transformation des ondes sonores en message nerveux (**figure. 2.1**).



**Figure 2.1 Système auditif périphérique** Le système auditif est un système bio-mécano-électrique qui transforme une onde acoustique vibratoire dans le milieu aérien (oreille externe) en une onde acoustique vibratoire mécanique dans le milieu solide (oreille moyenne) puis liquide (oreille interne) avant d'être transformée en un message nerveux, interprétable par le système nerveux central. L'oreille externe, représentée en rose, est constituée du pavillon et du conduit auditif externe. Elle est limitée par le tympan, qui signe le début de l'oreille moyenne. L'oreille moyenne (orange) comprend la chaîne des osselets : le marteau, l'enclume et l'étrier. Elle communique avec la trompe d'Eustache qui aide à égaliser la pression de part et d'autre du tympan. Enfin, l'oreille interne (jaune) est constituée du vestibule, organe de l'équilibre, et de la cochlée, organe de l'audition. La cochlée est constituée d'une paroi osseuse renfermant une structure membraneuse. Elle possède une fenêtré ovale, sur laquelle la platine de l'étrier vient s'appuyer et transmet l'onde acoustique au milieu liquidien de la cochlée ; et une fenêtré ronde, qui permet d'équilibrer la pression, par le mouvement de sa membrane élastique, en réponse au mouvement de la platine de l'étrier sur la fenêtré ovale. Schéma adapté de "Middle and Inner ear anatomy" BioRender.com (2022).

### 2.1.1 L'oreille externe

L'oreille externe est constituée par le pavillon et le conduit auditif externe (**figure 2.1**). Elle est limitée par une membrane souple, le tympan, qui la sépare de l'oreille moyenne. Le pavillon réceptionne les ondes acoustiques, focalise les ondes sonores dans le conduit auditif où elles sont amplifiées et dirigées vers le tympan. Le pavillon, mobile chez la plupart des mammifères, assure un rôle d'antenne acoustique "orientable", ce qui permet d'augmenter les chances de détection des ondes sonores dans une direction donnée. Le conduit auditif externe prolonge le pavillon. C'est un canal cartilagineux et osseux qui fait suite à la conque (dépression profonde en forme d'entonnoir occupant la partie moyenne du pavillon) et qui s'étend jusqu'au tympan. Chez l'homme, il mesure en moyenne 25 mm de long. Dans le conduit auditif externe, certaines fréquences, par un système de résonance, peuvent être amplifiés spécifiquement. Ainsi, chez l'homme des fréquences situées entre 2 et 7 kHz peuvent obtenir un gain d'environ 10 dB. Par ailleurs, les circonvolutions du pavillon aident à la localisation spatiale. Le regroupement des informations provenant des deux oreilles disjointes (mesure de la différence interaurale de phase et de temps) participe également, à un niveau plus central, à la localisation spatiale et temporelle. Ainsi, l'oreille externe capte, focalise l'onde sonore et participe à la localisation spatiale et temporelle du message acoustique.

### 2.1.2 L'oreille moyenne

L'oreille moyenne est un adaptateur d'impédance, permettant de passer d'une onde acoustique conduite en milieu aérien à une onde acoustique conduite en milieu liquidien. Anatomiquement, l'oreille moyenne est une cavité osseuse située entre l'oreille externe et l'oreille interne (**figure 2.1**), derrière l'os temporal. Elle se compose de la membrane tympanique, la caisse tympanique, la trompe d'Eustache et les cavités mastoïdiennes. La trompe d'Eustache est localisée sur le fond de la caisse tympanique, et débouche sur le rhinopharynx.

Elle a pour rôle principal d'égaliser la pression d'air de part et d'autre de la membrane tympanique. Chez l'enfant, la trompe d'Eustache est courte et horizontale. Progressivement avec l'âge, la trompe s'allonge et prend une direction oblique, en bas et vers l'avant. La caisse tympanique forme une cavité aérienne dans laquelle s'articulent trois os (le marteau, l'enclume et l'étrier) et deux muscles (le muscle tenseur du tympan et le muscle stapédien). Le marteau, l'enclume et l'étrier sont les plus petits os du corps humain et forment la chaîne ossiculaire : celle-ci relie le tympan à la fenêtre ovale, membrane souple séparant l'oreille moyenne de l'oreille interne. La tête du marteau prend appui sur la membrane tympanique et l'étrier sur la fenêtre ovale de la cochlée. A l'arrivée d'une onde sonore, la membrane tympanique entre en mouvement. Cette énergie mécanique est transmise à la chaîne des osselets qui, par un effet de rapport de surface, amplifie entre 15 et 30 fois la pression d'entrée avant de la transmettre au milieu liquidien dans la cochlée par l'intermédiaire de la fenêtre ovale (Onerci, 2010). L'oreille moyenne est un adaptateur d'impédance sans lequel une très grande partie de l'énergie acoustique serait perdue.

L'oreille moyenne a également un rôle de protection contre les sons de forte intensité (c'est-à-dire supérieure à 80 dB HL, pour *hearing level*). En effet, un réflexe bilatéral polysynaptique appelé réflexe stapédien se met en place en réponse aux sons forts, en activant la contraction du muscle stapédien et en limitant ainsi la chaîne tympano-ossiculaire dans sa réponse aux stimulations auditives. Ce réflexe est d'autant plus présent pour les sons de basses et moyennes fréquences (fréquence inférieure à 2000 Hz). L'atténuation du stimulus peut aller jusqu'à 20 dB (Legent *et al.*, 2011). Cependant, il est fatigable et perd son efficacité pour des stimulations de longue durée. Ce réflexe possède donc 2 principales fonctions : a) il protège l'oreille interne b) il réduit l'effet de masque et permet une meilleure discrimination des fréquences aiguës, dont la parole.

### 2.1.3 L'oreille interne

L'oreille interne est composée de deux organes : la cochlée, organe de l'audition et le vestibule, organe de l'équilibre. Tous deux sont connectés anatomiquement et présentent des caractéristiques communes : présence de liquide endolymphatique et de cellules sensorielles polarisées. Les fibres nerveuses issues de la cochlée et celles issues du vestibule se rejoignent pour former le nerf cochléo-vestibulaire (**figure 2.1**). La cochlée est au contact de la platine de l'étrier qui vient s'appuyer sur la fenêtre ovale (**figure 2.1**). Elle se trouve dans la bulle tympanique chez la majorité des mammifères et est enchâssée dans une région poreuse de l'os temporal, le rocher, chez les primates.

## 2.2 La cochlée

La cochlée constitue une structure osseuse, qui s'est formée au cours du développement embryonnaire au sein de la capsule otique. Cette structure osseuse renferme le labyrinthe membraneux antérieur. Elle prend la forme d'un limaçon (**figure 2.2**), enroulé autour d'un axe central osseux, appelé modiolus, renfermant les fibres du nerf auditif. La cochlée est composée par trois canaux : le canal vestibulaire, le canal tympanique et le canal cochléaire (**figure 2.3**). Le canal vestibulaire et le canal tympanique contiennent tous deux la périlymphe, solution physiologique riche en sodium, et se rejoignent à l'apex de la cochlée au niveau de l'hélicotreme. Le canal vestibulaire et le canal tympanique encadrent le canal cochléaire, qui contient l'endolymphe, solution physiologique riche en potassium (**figure 2.4**). Le canal cochléaire est délimité par la membrane de Reissner, la strie vasculaire et l'organe Corti, siège de la mécano-transduction.

Chez l'homme, la cochlée atteint sa taille adulte au cours du développement ([Pujol et al., 1998](#); [Sato et al., 1991](#)). Des études portant sur l'introduction de l'électrode de l'implant

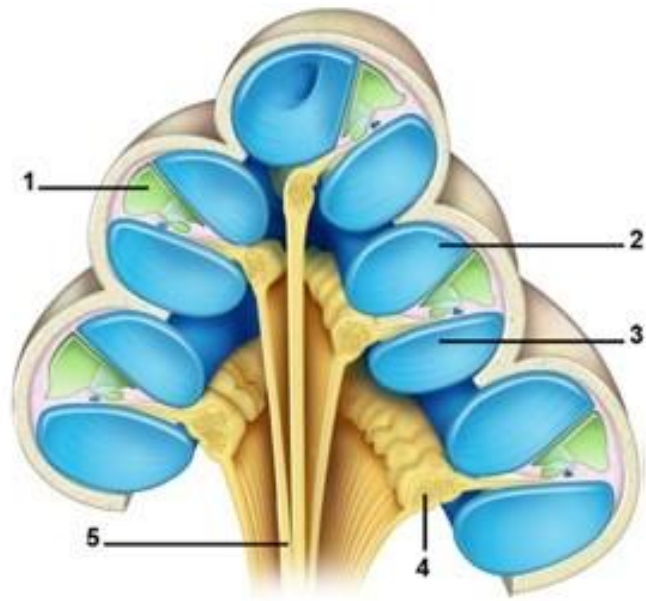
cochléaire ont mis en évidence l'existence de variations individuelles dans l'anatomie cochléaire (Meng *et al.*, 2016; Thong *et al.*, 2017). Ces variations ne sont pas liées à l'âge ni au côté (Pelliccia *et al.*, 2014) et suivent certaines proportions. La largeur de la base de la cochlée est liée à la longueur linéaire de la cochlée. Par ailleurs, (Meng *et al.*, 2016) montre que certains angles du tour cochléaire (l'angle dans le premier tour et entre le premier et le second tour) peuvent être prédit à partir des dimensions de la base cochléaire.

En 2019, Braga *et al.* montrent à partir de représentations 3D de cochlées la présence d'un dimorphisme sexuel chez l'homme, présent dès la naissance (Braga *et al.*, 2019). Les observations montrent une différence dans la torsion (i.e, l'angle de courbure et l'allongement) de la spire cochléaire, d'autant plus marqué en s'approchant de l'apex.

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



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



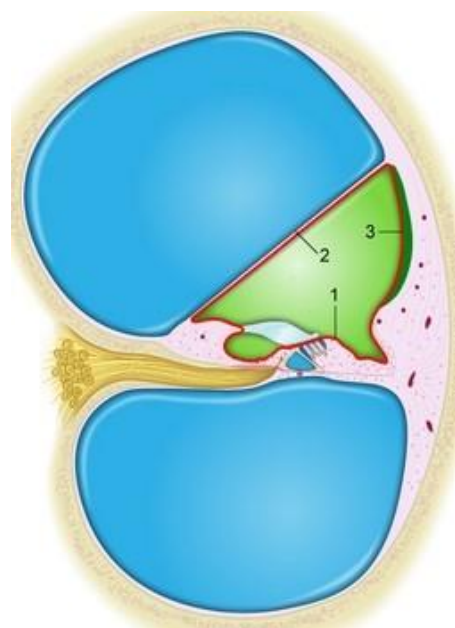
### 2.2.1 Les fluides cochléaires

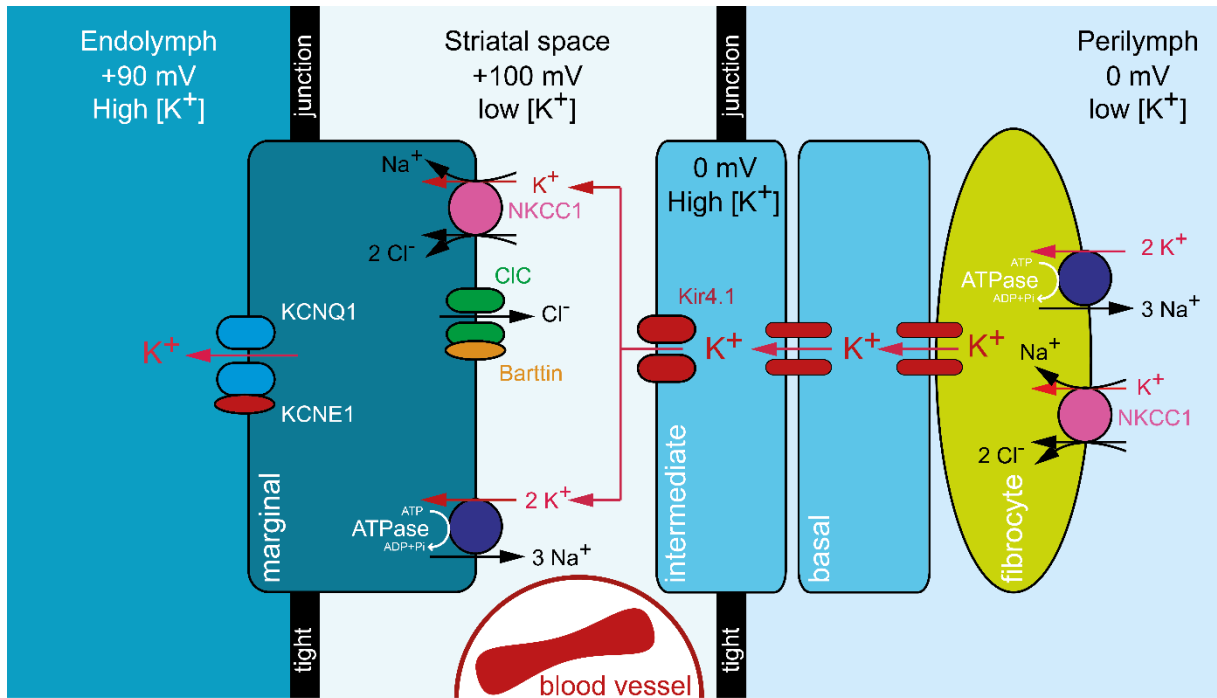
Dans la cochlée, l'endolymphe est présente dans la rampe cochléaire. Elle est séparée de la périlymphe située dans la rampe vestibulaire par la membrane de Reissner et de la périlymphe présente dans la rampe tympanique par l'épithélium présent sur la membrane basilaire (c'est-à-dire l'organe de Corti et les cellules épithéliales appelées sulcus interne et externe). Latéralement, le revêtement épithélial du ligament spiral et la strie vasculaire ferment le canal cochléaire (**figure 2.4**). Des jonctions serrées présentes sur l'ensemble de l'épithélium du canal cochléaire forment la "barrière périlymphe-endolymphatique" cochléaire. Au cours du développement, la composition ionique de l'endolymphe se développe parallèlement à la maturation morphologique de la strie vasculaire (Hibino *et al.*, 1997). Seule la partie apicale de la cellule ciliée, c'est-à-dire la plaque cuticulaire et les stéréocils, est exposée à la forte concentration de potassium de l'endolymphe. Le corps de la cellule ciliée est entouré par la périlymphe, fluide dont la composition ionique riche en sodium est proche de celle des liquides



extracellulaires et du liquide céphalo-rachidien. La strie vasculaire est composée par trois types de cellules : les cellules basales, intermédiaires et marginales (**figure 2.5**). L'activité de la strie vasculaire se traduit par la présence d'un potentiel endolymphatique de plus de +80 mV, appelé potentiel endocochléaire, au sein du canal cochléaire (Lang *et al.*, 2007; Nin *et al.*, 2008; Wangemann, 2002). Le potentiel endocochléaire prend naissance dans l'espace intrastral de 15 nm d'épaisseur, entre les cellules intermédiaires et marginales (Ikeda and Morizono, 1989; Salt *et al.*, 1987). Dans cet espace, le potassium sécrété par les cellules intermédiaires est activement transporté dans les cellules marginales par des pompes ATPases  $N^+/K^+$  et NKCC entraînant une faible concentration d'ions potassium (1 mM) dans l'espace intrastral. En raison du potentiel intracellulaire entre 0 à 4 mV et une concentration en potassium d'environ 60 mM dans l'ensemble du syncytium fibrocytes-cellules basales-cellules intermédiaires, le potentiel intrastral est de l'ordre de 90 mV et est responsable du potentiel endocochléaire (**figure 2.5**). Le maintien du potentiel intrastral est due à l'isolation électrique de l'espace intrastral des autres fluides extracellulaires grâce à des jonctions serrées (Nin *et al.*, 2008) . Le transport du potassium vers l'endolymphe est ensuite assuré par les canaux KCNQ1 et KCNE1 localisés à la membrane apicale des cellules marginales (**figure 2.5**).

**Figure 2.4 : Schéma d'une coupe transversale de la cochlée.** Le canal cochléaire, rempli d'endolymphe (vert), est délimité par la lame réticulaire qui recouvre l'organe de Corti (1), par la membrane de Reissner (2) côté rampe vestibulaire, et par le mur latéral (3) constitué de la strie vasculaire et du promontoire. L'organe de Corti repose sur la membrane basilaire. Les cellules ciliées ayant un potentiel de membrane compris entre -40 mV et -55 mV, le potentiel électrique entre les deux compartiments (scala média – cellules ciliées) favorise l'entrée massive de cations dans les cellules ciliées. Schéma : Pujol *et al.*, <http://www.cochlea.eu/cochlee>.





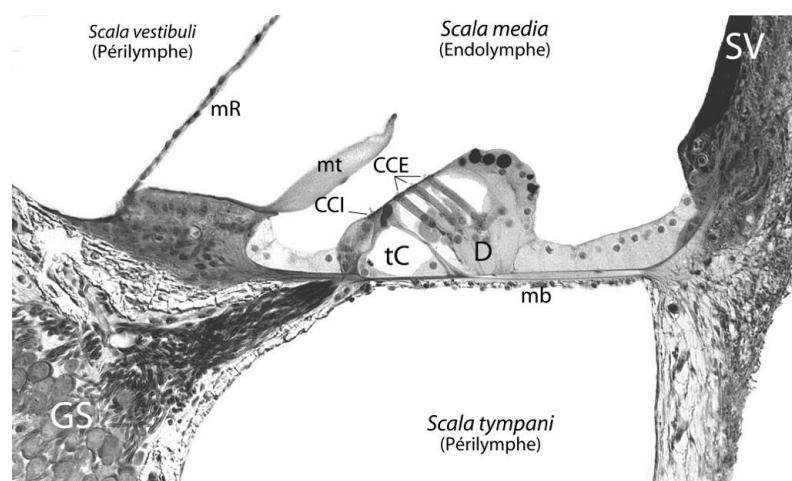
**Figure 2.5 : Schéma représentant les cellules de la strie vasculaire.** Le potentiel endocochléaire prend naissance dans l'espace striatal. Le flux de potassium depuis les fibrocytes jusqu'à l'endolymph est assuré par des pompes ATPases et des transporteurs du chlore NKCC. La faible concentration de potassium dans l'espace striatal associée à un potentiel de 0 mV des cellules intermédiaires entraîne un potentiel de 90 mV au sein de l'espace striatal. Schéma : Dr. Régis Nouvian.

En raison du potentiel endocochléaire et du potentiel de membrane des cellules ciliées (-40 mV pour les cellules ciliées externes et -55 mV pour les cellules ciliées internes), la forte différence de potentiel électrique favorise l'entrée des cations (majoritairement potassiques et calciques) dans les cellules ciliées lors de l'ouverture des canaux sensibles à l'étirement, situés dans les stéréocils des cellules ciliées.

## 2.2.2 L'organe de Corti

C'est à la racine du canal cochléaire et au-dessus de la membrane basilaire que l'on trouve l'épithélium neurosensoriel de l'audition, appelé l'organe de Corti. L'organe de Corti doit son nom à l'anatomiste Alfonso Corti, qui en fit la première description détaillée en 1851. L'organe de Corti contient deux principaux types de cellules sensorielles : les cellules ciliées externes (CCE) qui amplifient l'onde sonore localement, et les cellules ciliées internes (CCI) qui traduisent l'onde acoustique en un message nerveux. Ce dernier est relayé par les fibres du nerf auditif, jusqu'au cortex auditif primaire, le long de la voie auditive ascendante. Cet organe est donc composé de cellules sensorielles, de fibres nerveuses, de cellules de soutien et de cellules non sensorielles (**figure 2.6**).

**Figure 2.6 : Section transversale d'un tour de spire de la cochlée.** Coupe transversale effectuée au niveau du troisième tour d'une cochlée de cobaye visualisée en microscopie optique. Dans l'organe de Corti, la rangée de cellules ciliées internes (CCI) et les trois rangées de cellules ciliées externes (CCE) sont disposées de part et d'autre du

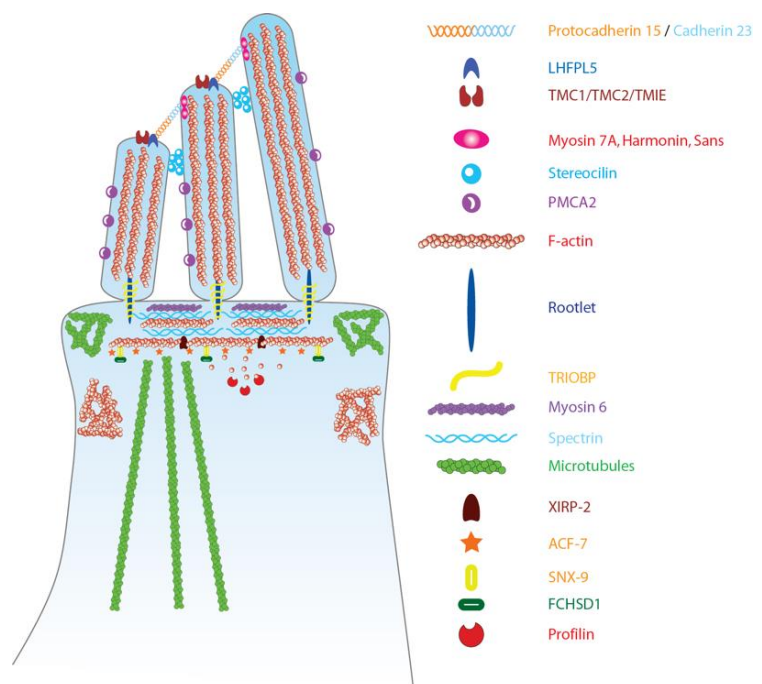


tunnel de Corti (tC). Les CCE, dont la base repose sur les cellules de Deiters (D), modulent la transduction par des processus mécaniques actifs. Ceux-ci amplifient les mouvements de la membrane basilaire (mb) en un point précis dépendant de la fréquence, facilitant la stimulation des CCI et permettant l'envoi vers le cerveau d'un message bioélectrique finement accordé. mR : membrane de Reissner ; mt : membrane tectoriale; SV : Strie Vasculaire. GS : ganglion spiral. La barre d'échelle correspond à 100  $\mu$ M. Photo : Marc Lenoir (Inserm U1051).

### 2.2.3 Mécanotransduction des cellules ciliées

La mécanotransduction correspond à la transformation par les cellules ciliées de l'onde acoustique, une énergie mécanique, en message électrochimique appelé potentiel récepteur (Fettiplace, 2017; Gillespie and Müller, 2009; Ó Maoiléidigh and Ricci, 2019). Le nom de cellule ciliée s'explique par la présence d'un faisceau de stéréocils à leur pôle apical. Ce faisceau est composé d'une centaine de stéréocils disposés sur trois rangées de taille croissante et de diamètre d'environ 200 nm pour les CCE et 400 nm pour les CCI (figure 2.9). Les stéréocils sont essentiellement composés par l'alignement parallèle de filaments d'actine ( $\beta$ - et  $\gamma$ -isoformes) (Bartsch *et al.*, 2019; Tilney *et al.*, 1992). Au cours du développement, une structure semblable aux stéréocils, le kinocil, contrôle la formation et l'orientation des stéréocils. Contrairement à ces derniers, le kinocil est un cil constitué de microtubules. Lors de l'entrée en fonction de la cochlée, le corps du kinocil disparaît et seule sa base, appelée corps basal, reste ancrée dans la plaque cuticulaire (Montcouquiol and Kelley, 2020).

**Figure 2.7 : Principaux constituants des stéréocils et de la plaque cuticulaire.** Outre les filaments d'actine, les stéréocils et la plaque cuticulaire sont constitués de diverses protéines associées au cytosquelette. Une première population de microtubules forme un anneau autour de la plaque cuticulaire. Juste en-dessous, se trouvent les filaments d'actine qui constituent la bande circulaire. Une seconde population de microtubule en provenance du cytoplasme pénètre la plaque cuticulaire. Schéma : Dr. Régis Nouvian.



Les stéréocils sont reliés les uns aux autres par des attaches latérales (Michalski *et al.*, 2007) et par des structures en double hélice appelées tip-links (Kachar *et al.*, 2000). Les tip-links constituent les liens terminaux, ils sont présents au pôle apical des stéréocils et connectent la membrane latérale du stéréocil voisin. Ces derniers sont composés principalement de deux dimères de cadhérine (CDH), la protocadhérine 15 (PCDH15) (Kazmierczak *et al.*, 2007) qui forme la partie basse du tip-link, et la cadhérine 23 (CDH23) qui forme la partie haute du tip-link (Siemens *et al.*, 2004; Söllner *et al.*, 2004) (**figure 2.7**). L'utilisation de sondes calciques a démontré la présence des canaux de mécano-transduction, sensibles à l'étirement, uniquement à la base des tip-links reliant les deux premières rangées de stéréocils (Beurg *et al.*, 2009). Il y a environ 200 canaux de transduction par faisceau de stéréocils (Kazmierczak *et al.*, 2007).

L'arrivée d'une onde sonore provoque un mouvement de cisaillement des stéréocils contre la membrane tectoriale, dans laquelle les stéréocils sont ancrés (Hakizimana and Fridberger, 2021). Les stéréocils sont défléchis de façon synchrone en pivotant sur leur site d'insertion dans la plaque cuticulaire, un réseau dense d'actine situé sur la membrane plasmique. La tension exercée sur les tip-links lors du mouvement de déflexion des stéréocils entraîne l'ouverture d'un canal de transduction, situé à la base des tip-links des deux premières rangées de stéréocils. Etant donné le potentiel endocochléaire d'environ +100 mV et les potentiels de repos des cellules ciliées (-55 mV et -40 mV), la forte différence de potentiel électrique favorise l'entrée de cations, essentiellement de potassium, depuis l'endolymphe vers les cellules ciliées. La sortie de potassium des cellules ciliées vers la périlymphe est assurée par des canaux potassiques sensibles au potentiel, comme les canaux de types BK, selon le gradient électro-chimique du potassium ; l'activation des cellules sensorielles n'est donc pas tributaire de la consommation d'ATP, à l'inverse de l'activité de la strie vasculaire. De plus, ce mécanisme évite une modification de la composition ionique des cellules ciliées avec un petit volume cytoplasmique, à savoir les CCE de la base de la cochlée. Enfin, la localisation des

canaux BK à la partie apicale des CCI prévient une accumulation de potassium aux synapses qui aurait pour conséquence de dépolariser des fibres du nerf auditif innervant les cellules ciliées internes (Pyott *et al.*, 2004).

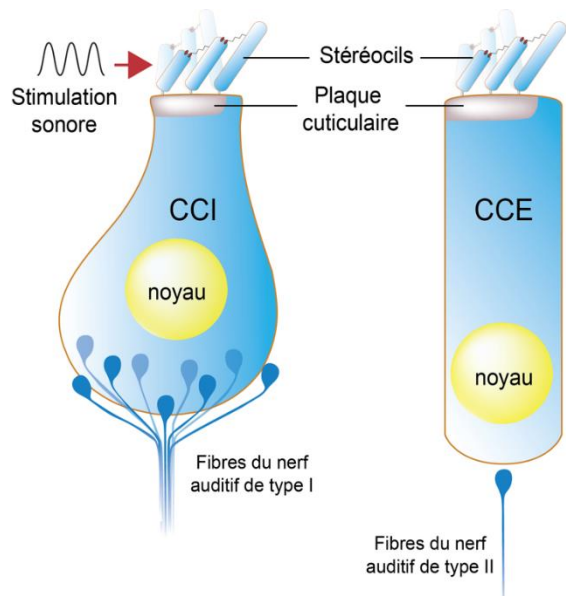
Le canal de transduction est un canal cationique non sélectif, sensible à l'étirement ((Fettiplace, 2017; Fettiplace and Kim, 2014)). La perméabilité à plusieurs molécules telles que le TEA, la dihydrostreptomycine ou bien le FM1-43 a permis de prédire le diamètre du pore à 1,2 nm. L'application de chélateurs calciques, comme le BAPTA qui provoque la destruction des tip-links, a permis de mesurer l'activité du courant de transduction à l'échelle unitaire et de démontrer que le canal existe selon deux conformations : ouvert ou fermé, avec une conductance de 100 pS, bien plus ample que celle des récepteurs nicotiques de 30 pS. Cette approche a aussi mis en évidence l'augmentation de la conductance unitaire le long de l'axe tonotopique, de l'apex (80 pS) à la base (130 pS) de la cochlée (Ricci *et al.*, 2003). La cinétique d'activation est rapide de l'ordre de la centaine de microsecondes, voire probablement de la dizaine de microsecondes, et l'adaptation du courant, correspondant à la diminution du courant au cours de la déflexion des stéréocils afin d'éviter une saturation du courant en réponse à des stimulations plus amples, est dépendante du calcium. Au niveau moléculaire, le canal de mécano-transduction mature serait composé par l'assemblage des protéines TMC1, TMC2 (transmembrane channel-like protein) (Giese *et al.*, 2017; Kawashima *et al.*, 2011; Kurima *et al.*, 2015; Ó Maoiléidigh and Ricci, 2019; Pan *et al.*, 2013, 2018), LHFPL5 (dénommée aussi TMHS pour tetraspan membrane protein of hair cell stereocilia) (Xiong *et al.*, 2012), TMIE (transmembrane inner ear) (Zhao *et al.*, 2014) et CIB2 (Calcium and Integrin-Binding Protein 2) (Michel *et al.*, 2017).

Le mode d'activation du canal de mécanotransduction reste pour l'instant controversé. Une première hypothèse propose que l'extrémité des tip-links interagisse directement avec le canal de transduction. Dans ce modèle, le déplacement des stéréocils provoque un étirement

des tip-links, ce qui entraîne l'ouverture du canal de transduction. Ici, les tip-links se comporteraient comme des ressorts ce qui pourrait expliquer la forme sigmoïdale de l'activation du courant de mécanotransduction en fonction des déplacements des stéréocils (Corey and Hudspeth, 1983; Howard and Hudspeth, 1988). Cependant l'élasticité des tip-links est fortement débattue, ce qui appelle à un autre substrat moléculaire pour assurer le rôle de ressort (Araya-Secchi *et al.*, 2016; Bartsch *et al.*, 2019; Kachar *et al.*, 2000; Sotomayor *et al.*, 2005, 2010, 2012; Tobin *et al.*, 2019). Dans ce modèle, le canal interagirait non seulement avec l'extrémité des tip-links mais serait associé au cytosquelette intracellulaire. Le complexe TMC-1/CIB2/ankyrin pourrait permettre l'association du canal au réseau du cytosquelette et l'ankyrine pourrait conférer la propriété de ressort (Tang *et al.*, 2020). Un deuxième modèle stipule que le canal ne serait pas physiquement associé ni aux tip-links, ni au cytosquelette intracellulaire. Dans ce modèle, la tension exercée sur la membrane plasmique serait responsable de l'ouverture du canal. En accord avec ce modèle, l'incorporation d'orthologues de TMC1 et TMC2 dans des liposomes entraîne des courants sensibles à la pression (Jia *et al.*, 2020). Un troisième modèle a été récemment proposé, permettant de réconcilier les deux modèles précédents (Zheng and Holt, 2021). Ici, l'extrémité des tip-links, constituée par la protocadhérine 15, interagit physiquement avec la protéine LHFPL5, insérée dans la membrane plasmique. Le mouvement des stéréocils provoquerait le déplacement des tip-links et via l'interaction avec LHFPL5, la déformation de la membrane plasmique. La tension exercée par la membrane provoquerait l'ouverture du canal, lui-même étant associée au réseau de cytosquelette par le complexe TMC-1/CIB/ankyrin. L'ankyrin doterait le système de mécanotransduction de propriétés de ressort.

**Figure 2.8 : Représentation schématique des**

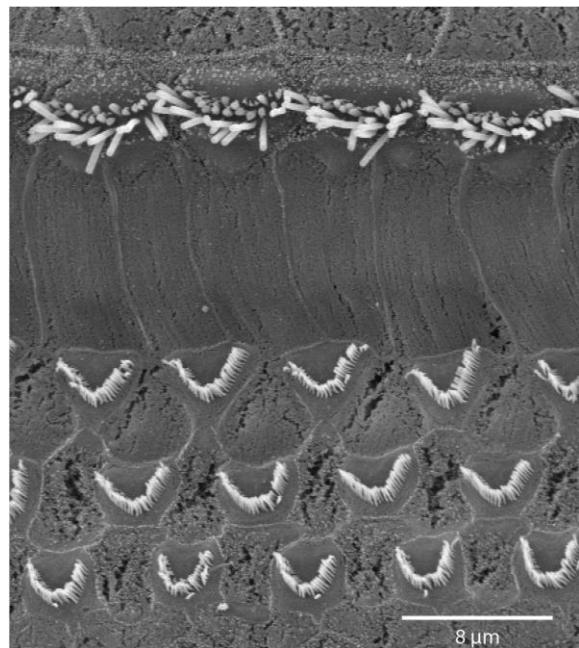
**cellules ciliées.** Gauche : Cellule ciliée interne (CCI). Droite : Cellule ciliée externe (CCE). Les cellules ciliées sont dotées d'un faisceau de stéréocils, qui détectent les ondes sonores. Les stéréocils sont ancrés dans la plaque cuticulaire, une structure riche en actine et sont reliés entre eux par des filaments appelés tip-links. L'extrémité de ces derniers est connectée à un canal sensible à l'étirement. En réponse à une stimulation sonore, le canal mécano-transducteur s'ouvre et permet l'influx de cations, principalement du potassium et du calcium en raison de la composition de l'endolymphe (seuls les stéréocils baignent dans l'endolymphe, le corps cellulaire des CCI et CCE



baigne dans la périlymphe). L'entrée de cations dépolairise alors les CCI et CCE. Tandis que 95 % des fibres du nerf auditif sont connectés avec les CCI et forment les fibres de type I, seulement 5 % des fibres (de type II) projecttent sur les CCE. Schéma : Dr. Régis Novian.

**Figure 2.9 : Stéréocils des cellules ciliées auditives chez la souris en microscopie électronique**

**à balayage.** Les stéréocils sont des expansions cytoplasmiques constituées de filaments d'actine, dont la taille est largement supérieure à celle des microvillis. Chaque stéréocil forme une racine (R) caractérisée par une extrême compaction d'un petit nombre de filaments d'actine. Les racines s'insèrent dans la plaque cuticulaire, elle-même, composée d'un enchevêtrement de filaments d'actine. Les stéréocils des CCI se distinguent de ceux des CCE par leur organisation : en U ou en ligne pour les CCI et en V ou W pour les CCE. Barre d'échelle : 8µm.





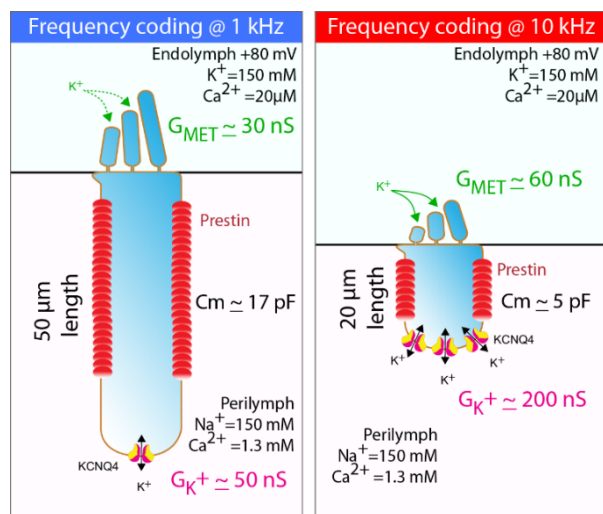
## 2.2.4 Mécanotransduction et potentiel de récepteur des cellules ciliées externes

Les cellules ciliées externes se distinguent des cellules ciliées internes par leur forme cylindrique et allongée (**figure 2.8**). Leur taille augmente graduellement suivant l'axe tonotopique de la cochlée de la base vers l'apex. Elles sont présentes sur trois rangées, et sont au nombre de 13 000 environ chez l'humain (Ashmore, 2008). Situées sur le bord extérieur des cellules du pilier externe, les CCE sont séparées latéralement les unes des autres par les espaces de Nuel ; et sont enchâssées sur les cellules de soutien, appelées cellules de Deiter. Le pôle apical des CCE et l'extrémité des phalanges de Deiters forment la lame réticulaire, une mosaïque parfaitement étanche à l'endolymphe. La paroi latérale des CCE est tapissée d'un complexe de citernes latérales et de mitochondries. Le noyau des CCE est situé à la base des cellules (**figure 2.8**), juste au-dessus du compartiment synaptique qui renferme de nombreuses mitochondries. Il y a un à deux rubans synaptiques par CCE, elle-même innervée par les fibres auditives de type 2 qui représentent environ 5 à 10 % de l'ensemble des fibres du nerf auditif. Le faisceau de stéréocils des CCE est enchâssé dans la membrane tectoriale, en forme de W et sa forme varie en fonction de la localisation cochléaire : très ouvert à la base, très fermé à l'apex.

La faible concentration de calcium dans l'endolymphe (50  $\mu\text{M}$ ) et la forte concentration de tampons calciques endogènes de l'ordre du millimolaire dans les CCE limitent la fermeture du canal de transduction par le calcium. Ainsi, 50 % des canaux se trouvent à l'état ouvert au repos chez les CCE, entraînant un large courant de fuite entrant au repos. Ce dernier dépolarise la CCE ce qui favorise l'ouverture du canal  $K_{v7.4}$ , responsable du courant potassique  $I_{kn}$ , situé à la base de la cellule et assurant la sortie de potassium. La mise en jeu du courant de transduction et du courant  $I_{Kn}$ , fixe le potentiel de membrane des CCE à -40 mV. Lors d'une stimulation sonore, la zone de compression va défléchir les stéréocils et provoquer l'ouverture des 50 % de canaux de transduction restant pour dépolariser la cellule. Lors de la phase de

raréfaction de l'onde sinusoïdale, la totalité des canaux de transduction vont se fermer provoquant l'hyperpolarisation de la cellule. Le potentiel de récepteur des CCE, appelé potentiel microphonique aura donc une forme sinusoïdale avec des excursions autour du potentiel de membrane. En raison de l'augmentation des conductances du courant de transduction de courant  $I_{Kn}$  et de la diminution de la taille des CCE le long de l'axe tonotopique (gradient de l'apex à la base), la constante de temps membranaire, qui correspond au temps nécessaire pour que la cellule se dépolarise à 63 % de sa valeur maximale et qui est égal au produit  $RC$ , où  $R$  est la résistance membranaire,  $C$  la capacité membranaire, diminue le long du gradient apico-basal (Johnson *et al.*, 2011; Mammano and Ashmore, 1996). Ainsi, la membrane plasmique des CCE pourrait suivre en phase les stimulations sonores supérieures à 10 kHz.

**Figure 2.10 : Variations tonotopiques des propriétés biophysiques de la CCE.** Le canal ionique KCNQ4 et la prestine sont exprimés différemment le long de l'axe tonotopique de la cochlée. De plus, la taille de la CCE diminue progressivement vers le tour basal de la cochlée, codant pour une stimulation sonore à haute fréquence. L'augmentation de la conductance ionique et la réduction de la capacité de la membrane confèrent aux CCE un comportement électromoteur à haute fréquence. Schéma : Dr. Régis Nouvian



## 2.2.5 Electromotilité des cellules ciliées externes

Les variations du potentiel transmembranaire des CCE entraînent une modification de leur longueur : les CCE se raccourcissent lors d'une dépolarisation et à l'inverse s'allongent en réponse à une hyperpolarisation (Brownell *et al.*, 1985). L'électromotilité a été attribuée à la présence d'un moteur moléculaire localisé dans la membrane plasmique (Huang and Santos-

Sacchi, 1994) (**figure 2.10**). Une signature de l'électromotilité est la capacité non-linéaire des CCE (Tunstall *et al.*, 1995). Celle-ci reflète les mouvements de charge du moteur en réponse à un changement de potentiel transmembranaire. La courbe exprimant cette capacité membranaire en fonction du potentiel transmembranaire prend une forme en cloche caractéristique. Le clonage de la protéine prestine, par l'équipe du Pr. Peter Dallos, a permis de découvrir la nature du moteur moléculaire à l'origine de l'électromotilité (Dallos, 2008; Zheng *et al.*, 2000). La prestine ou SLC26A5 est une protéine piézoélectrique appartenant à la famille des transporteurs d'anions SLC26 et ayant la propriété de changer de conformation en fonction du potentiel de membrane. L'expression de la prestine dans des systèmes hétérologues provoque un changement de longueur des cellules en réponse à un saut de potentiel et leur confère une capacité non-linéaire comparable à celle des CCE. Le changement de conformation de la protéine selon le potentiel transmembranaire déformerait la surface de la membrane plasmique et serait responsable du changement de taille des cellules (Bavi *et al.*, 2021; Butan *et al.*, 2022; Ge *et al.*, 2021). En accord avec le rôle essentielle de la prestine dans le codage dans l'amplification et la sélectivité en fréquence, l'inactivation chez la souris du gène *slc26a5* (gène codant pour la prestine) entraîne la perte de l'électromotilité des CCE (Lieberman *et al.*, 2002; Santos-Sacchi and Tan, 2018; Santos-Sacchi *et al.*, 2019). Notons cependant que d'autres mécanismes complémentaires seraient nécessaires pour assurer un codage aux hautes fréquences (He *et al.*, 2018; Santos-Sacchi and Tan, 2019; Vavakou *et al.*, 2019).

### 2.2.6 Mécanotransduction et potentiel de récepteur des cellules ciliées internes

Les CCI sont situées dans l'organe de Corti, proche du modiolus et sont disposées en une seule rangée. Elles sont encadrées par les cellules de Bord et les cellules phalangeales. Chez

l'homme, on distingue environ 3000 CCI dans la cochlée, et chez la souris 800 (Ehret and Frankenreiter, 1977). De forme arrondie en poire, elles présentent un noyau en position médiane, une membrane plasmique latérale classique et un pôle apical avec un faisceau de stéréocils en U dont l'ouverture s'agrandit en allant vers la base où ils ne forment plus qu'une ligne (**figure 2.8 et 2.9**). En raison d'une faible concentration de tampons calciques endogènes par rapport aux CCE, le calcium favorise la fermeture de 95% des canaux de transduction au repos dans les CCI. Une stimulation de forme sinusoïdale des stéréocils va donc générer un courant de transduction entrant fortement asymétrique, à l'inverse du courant symétrique des CCE. Par conséquent, le potentiel de récepteur des CCI, le potentiel de sommation, sera de forme asymétrique. Le potentiel de récepteur des CCI se caractérise par deux composantes : une composante alternative (AC) qui suit la fréquence de la stimulation et une composante continue (DC) qui reproduit l'enveloppe de la stimulation sonore. En réponse à des stimulations sonores de fréquences inférieures à 1-2 kHz, le potentiel de membrane des CCI suit les cycles de la fréquence sonore, ce qui correspond à des cycles de dépolarisation-repolarisation en phase avec l'onde sinusoïdale (Palmer and Russell, 1986). Ici, la composante alternative domine la réponse électrique des CCI. Au-delà de 1 à 2 kHz, la constante de temps membranaire  $\tau$  (égale au produit RC et environ égale à 500  $\mu$ s (Johnson *et al.*, 2011; Kros and Crawford, 1990; Oliver *et al.*, 2006)) empêche la membrane plasmique de suivre en phase les cycles de la stimulation. En d'autres termes, la membrane plasmique n'a pas le temps de se dépolariser et repolariser à chaque cycle de la stimulation : la composante continue est alors prédominante (DC) et le potentiel de sommation suit l'enveloppe de la stimulation sonore (**figure 2.13**)(Russel and Sellick, 1978).

### 2.2.7 La synapse à ruban des cellules ciliées internes

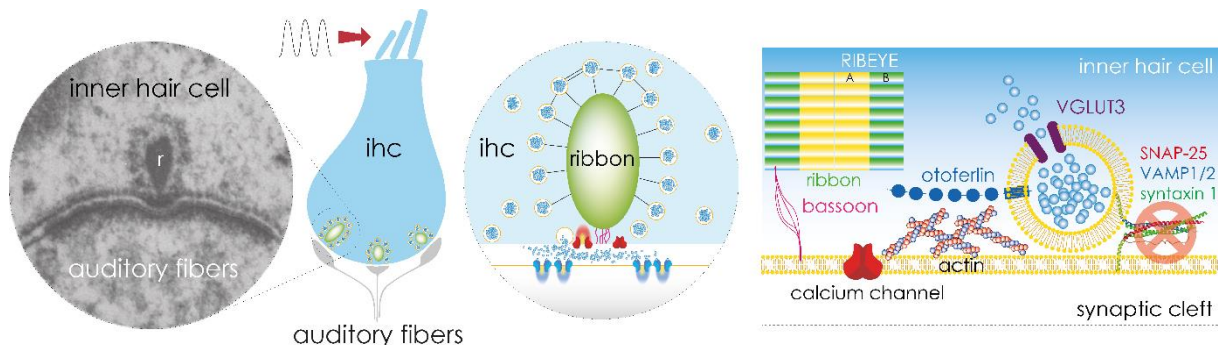
Chaque zone active d'une CCI se caractérise par une structure dense aux électrons appelée ruban synaptique (**figure 2.11**, (Nouvian *et al.*, 2006)). Les rubans synaptiques sont ancrés à la membrane plasmique et entourés d'une centaine de vésicules, lesquelles contiennent du glutamate, le neurotransmetteur des CCI (Khimich *et al.*, 2005). Chez les CCI adultes, il y a un ruban par synapse et entre 6 à 20 synapses par CCI, ce nombre variant selon la localisation cochléaire (Meyer and Moser, 2010; Meyer *et al.*, 2009). A noter que parmi le nombre total de rubans contenu dans une cellule, 5% sont localisés dans le cytoplasme (rubans flottants cytoplasmiques) et reflètent probablement le recyclage des rubans à la membrane. Cependant, les rubans synaptiques sont relativement immobiles sur plusieurs minutes (entre 0.35 to 13.5 nm/sec; (Zenisek *et al.*, 2004)). Chaque zone active est connectée par la terminaison d'une seule fibre du nerf auditif. La forme des rubans varie en fonction des espèces ou bien de l'âge (Payne *et al.*, 2021). Par exemple, les rubans de cellules vestibulaires de la grenouille sont ronds (diamètre 400 nm environ), à l'inverse chez la souris on observe des rubans de forme ovoïde dans les CCI adultes (diamètre 300, 200 et 50 nm) et de multiples rubans par synapse chez les CCI immatures. A noter que les photorécepteurs, cellules bipolaires de la rétine, les cellules vestibulaires et pinéalocytes possèdent elles aussi des rubans à leur synapse (tom Dieck *et al.*, 2005; Nouvian *et al.*, 2006).

Le nombre de synapses varie en fonction de l'axe tonotopique avec un maximum de synapses par cellule ciliée dans les régions de la cochlée à bas seuils auditifs (meilleure sensibilité). Les dimensions des rubans restent constantes le long de l'axe tonotopique et au sein d'une même cellule ciliée chez la cochlée de souris (Meyer *et al.*, 2009; Payne *et al.*, 2021). En revanche, il semble que la forme des rubans diffère selon l'axe modiolus-pilier, avec des rubans de grande taille côté modiolus et des rubans de petite taille côté pilier (**figure 2.14**), dans la cochlée de chat (Merchan-Perez and Liberman, 1996) et de souris (Payne *et al.*, 2021). A

l'apex de la cochlée, codant les fréquences graves, on note des synapses côté modiolus avec plusieurs rubans (Merchan-Perez and Liberman, 1996; Michanski *et al.*, 2019; Payne *et al.*, 2021). Les synapses à rubans sont concentrées au pôle baso-latéral des cellules avec une distance inter-synapse de 2  $\mu\text{m}$  (Meyer *et al.*, 2009). L'analyse ultrastructurale des CCI montre 1) des vésicules cytoplasmiques, 2) des vésicules reliées entre elles par un réseau de filaments (tethers) et attachées au ruban à une distance de 25 nm 3) des vésicules arrimées à la densité présynaptique et 4) des vésicules arrimées uniquement à la membrane plasmique par un seul filament. L'activité synaptique augmente le nombre de vésicules liées au ruban mais aussi le nombre de vésicules reliées à la membrane par un seul filament (Chakrabarti *et al.*, 2018; Lenzi *et al.*, 1999, 2002). Les protéines synaptiques des cellules ciliées semblent différer de celles des synapses conventionnelles (**figure 2.11**). Par exemple, RIBEYE, principal composant des rubans, est spécifique des synapses à rubans. Les canaux calciques sont de type Cav1.3 et non Cav2.x., VGLUT3 est le transporteur intra-vésiculaire du glutamate à l'inverse de l'expression majoritaire de VGLUT21 et VGLUT2 dans le cerveau. Otoferline est le détecteur calcique à la place des synaptotagmines (Beurg *et al.*, 2010). Enfin, l'exocytose des vésicules synaptiques semble être indépendante des protéines SNAREs neuronales, SNPA25, VAMP1/2 et syntaxin1 (Nouvian *et al.*, 2011).

Suite à la dépolarisation de la CCI et à l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants, l'entrée de calcium provoque la fusion des vésicules à la membrane et la libération du glutamate dans la fente synaptique. L'utilisation de tampons calciques a permis de distinguer deux contingents de vésicules synaptiques associés à la libération du neurotransmetteur : le premier contingent est associé à la fusion rapide ( $\tau = 9 \text{ ms}$ ) d'un nombre limité de vésicules synaptiques (moins de 50 vésicules par synapse), lesquelles sont probablement liées au ruban synaptique et arrimées à la membrane plasmique (RRP, pour *Readily Releasable Pool*). Le second contingent correspond à une fusion vésiculaire soutenue dans le temps avec 9000

vésicules/sec (SRP pour *Slowly Releasable Pool*). Cette seconde composante pourrait refléter la fusion de vésicules éloignées des canaux calciques et/ou le réapprovisionnement des vésicules aux zones actives (Goutman and Glowatzki, 2007; Johnson *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009; Moser and Beutner, 2000; Pangršič *et al.*, 2010; Rutherford and Roberts, 2006; Schnee *et al.*, 2005, 2011; Spassova *et al.*, 2004).



**Figure 2.11 : Composition moléculaire des synapses à rubans.** Seules quelques protéines ont été fonctionnellement identifiées à la première synapse auditive. RIBEYE est le composant majeur des rubans (Maxeiner *et al.*, 2016; Schmitz *et al.*, 2000). Bassoon assure l'ancrage des rubans à la membrane plasmique (Frank *et al.*, 2010; Hallermann *et al.*, 2010; Jing *et al.*, 2013; Khimich *et al.*, 2005). Les sous-unités Cav1.3 –  $\beta$ 2 forment les canaux calciques (Platzer *et al.*, 2000), harmonin et RIM2 $\alpha$ /2 $\beta$  régulent leur densité et CaBP2 contrôle leur inactivation (Gregory *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2015; Picher *et al.*, 2017). Cav1.3, harmonin et CaBP2 sont respectivement associées aux syndromes SANDD (arythmies et surdité ; Baig *et al.*, 2011), de Usher (cécité et surdité; (Richardson *et al.*, 2011)) et à la surdité non-syndromique DFNB93 (Schrauwen *et al.*, 2012). VGLUT3 remplit les vésicules synaptiques avec du glutamate (Akil *et al.*, 2012; Joshi *et al.*, 2021; Obholzer *et al.*, 2008; Ruel *et al.*, 2008; Seal *et al.*, 2008), rabconnectin est essentielle à leur acidification (Cho and von Gersdorff, 2012; Einhorn *et al.*, 2012; Vincent *et al.*, 2018) et otoferlin agit comme détecteur calcique, régule taux de fusion des vésicules à la membrane plasmique ainsi que le réapprovisionnement des vésicules synaptiques en glutamate (Michalski *et al.*, 2017; Pangršič *et al.*, 2010; Roux *et al.*, 2006). VGLUT3 et otoferlin sont à l'origine des surdités DFNA25 et DFNB9, respectivement, (Ruel *et al.*, 2008; Yasunaga *et al.*, 1999). Enfin, l'actine positionnerait les vésicules synaptiques par rapport aux canaux calciques (Furness *et al.*, 2005; Guillet *et al.*, 2016; Vincent *et al.*, 2017). Schéma : Dr. Régis Nouvian.

Le ruban synaptique pourrait organiser la zone active et notamment être responsable du couplage entre les vésicules synaptiques et les canaux calciques (Frank *et al.*, 2010; Khimich *et al.*, 2005; Maxeiner *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2013). D'autres modèles proposent que le ruban

concentre les vésicules pour faciliter leur adressage aux sites de fusion, (Bunt, 1971; Frank *et al.*, 2010; Graydon *et al.*, 2014; Holt *et al.*, 2004; Jackman *et al.*, 2009; Vaithianathan *et al.*; Zenisek *et al.*, 2000) ou bien leur amorçage, c'est-à-dire les rendre compétentes pour la fusion vésiculaire (Schwarz *et al.*, 2011; Snellman *et al.*, 2011). Le ruban pourrait, en limitant la diffusion du calcium, faciliter l'étape de fusion notamment dans l'hypothèse d'une libération multivésiculaire (Edmonds *et al.*, 2004; Fuchs, 2005; Graydon *et al.*, 2011; Mehta *et al.*, 2013), malgré l'hypothèse d'une libération mono vésiculaire (Chapochnikov *et al.*, 2014). Enfin le ruban pourrait être impliqué dans l'endocytose des vésicules synaptiques (Jung *et al.*, 2015; Khimich *et al.*, 2005; Lenzi *et al.*, 2002; Logiudice *et al.*, 2009; Schwarz *et al.*, 2011) et dans le réapprovisionnement des vésicules synaptiques (Becker *et al.*, 2018; Jean *et al.*, 2018).

## 2.3 Codage en fréquence

La fréquence d'une onde acoustique caractérise la hauteur du son. Un son grave est défini par une fréquence basse et à l'inverse, un son aigu est défini par une fréquence élevée. La notion de son grave et de son aigu reste relative à l'espèce. En effet, selon l'espèce animale, le champ auditif audible diffère. Le champ auditif humain s'étend sur l'intervalle [20 Hz – 20 kHz] alors que celui de la souris est compris sur l'intervalle [4 kHz – 63 kHz].

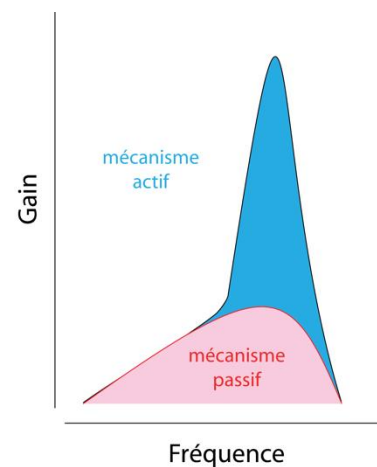
### 2.3.1 La tonotopie

L'arrivée d'une onde sonore dans la cochlée se propage le long de la membrane basilaire. Cette dernière entre en mouvement et atteint son maxima d'amplitude en un point localisé de la cochlée, qui est fonction de la fréquence de stimulation. Ainsi, un son de basse fréquence provoquera une oscillation maximale de la membrane basilaire à l'apex de la cochlée et un son



de fréquence élevée à la base de la cochlée. Ce principe de codage spatiale dans lequel chaque région de la cochlée correspond à une fréquence de stimulation est la tonotopie (Von Békésy, 1928, 1960). L'amplitude du mouvement de la membrane basilaire (mouvement évoqué par des stimulations sonores) représentée en fonction des fréquences de stimulation correspond à la courbe d'accord de la membrane basilaire, c'est-à-dire au champ récepteur de la cochlée. Les courbes d'accord indiquent donc les fréquences codées à différentes intensités. Les courbes d'accord ont une forme en « V », qui traduit la sélectivité en fréquence et la sensibilité de la cochlée. Dans les cochlées de cadavres, la forme en « V » est perdue, indiquant la perte de la sélectivité en fréquence et une élévation des seuils auditifs. La tonotopie repose donc sur deux mécanismes : les mécanismes passifs, dus aux propriétés mécaniques de la membrane basilaire (rigidité et masse) et les mécanismes actifs, à savoir un amplificateur qui augmente en un point précis de la membrane basilaire son amplitude (Gold, 1948) (**figure 2.12**). Une manifestation *in vivo* des mécanismes actifs est l'existence d'oto-émissions acoustiques : une fraction de l'énergie produite au sein de la cochlée pour l'amplification cochléaire, se propage vers l'oreille moyenne, met en mouvement la chaîne tympano-ossiculaire, ce qui entraîne la formation d'une onde sonore dans le conduit auditif, connue sous le nom d'émission oto-acoustique (Kemp, 1978).

**Figure 2.12 : Amplification de la cochlée.** Amplitude de la vibration de la membrane basilaire (Gain) en réponse à une stimulation sonore (Fréquence). L'amplification passive résulte des propriétés mécaniques de la membrane basilaire. L'activité des CCE confère à la cochlée les mécanismes actifs (augmentation de l'amplitude de la vibration de la membrane basilaire). Schéma : Dr. Régis Nouvian



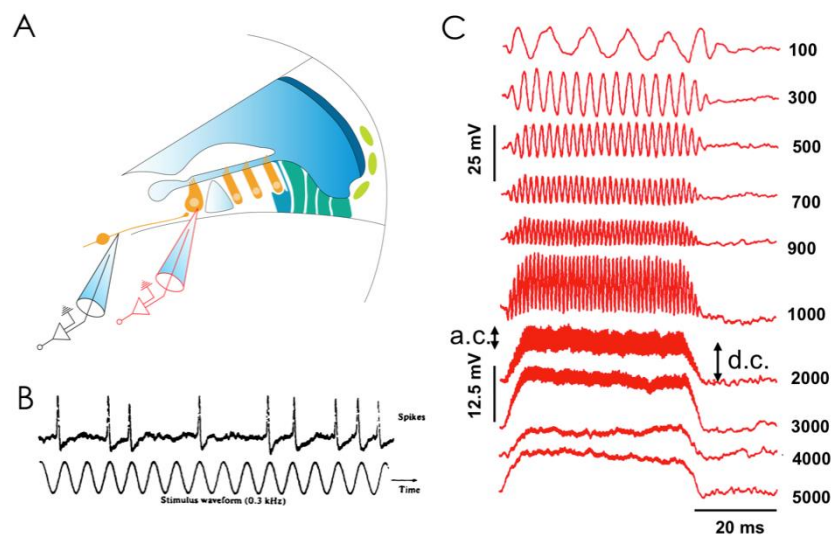
### 2.3.2 Mécanismes actifs et cellules ciliées externes

L'amplificateur cochléaire est étroitement lié aux CCE : l'électromotilité des CCE amplifierait les mouvements de la membrane basilaire, en un point précis, augmentant ainsi considérablement les déplacements des structures qui entraînent l'excitation des CCI, et par conséquent l'activation des fibres du nerf auditif. Le comportement électromotile des CCE permettrait ainsi l'amplification des ondes sonores et la sélectivité fréquentielle de la cochlée. Notons que l'invalidation chez la souris du gène *slc26a5* (gène codant pour la prestine) entraîne une perte d'audition de 45 à 65 dB (Lieberman *et al.*, 2002), soit le gain octroyé par les mécanismes actifs, et une perte de la sélectivité en fréquence. De plus, les oto-émissions acoustiques, témoins de l'activité des CCE, sont absentes chez la souris sans prestine (Lieberman *et al.*, 2002).

### 2.3.3 Le verrouillage en phase

A l'apex de la cochlée, les courbes d'accord sont plus évasées, indiquant une perte de la sélectivité en fréquence. Dans la région apicale, le codage en fréquence est assuré par le principe du verrouillage de phase (« le phase-locking » (Rose *et al.*, 1967)). Ce dernier repose sur le potentiel de récepteur des CCI. En réponse à des stimulations sonores de fréquences inférieures à 1-2 kHz, le potentiel de membrane des CCI suit les cycles de la stimulation acoustique, de forme sinusoïdale. A chaque dépolarisation de la cellule ciliée, l'entrée de calcium par les canaux calciques sensibles au potentiel provoque la libération du neurotransmetteur, le glutamate dans la fente synaptique. Le glutamate ouvre les récepteurs au glutamate de la fibre auditive ce qui entraîne l'émission d'un potentiel d'action dans la fibre auditive. Ainsi, à chaque dépolarisation de la CCI, un potentiel d'action est émis dans la fibre et l'information

fréquentielle est contenue dans l'intervalle de temps séparant deux potentiels d'action consécutifs : l'émission des potentiels d'action par la fibre est synchrone sur le cycle périodique de la stimulation sonore (**figure 2.13**). Au-delà de 1 à 2 kHz, la constante de temps membranaire  $\tau$  (égale au produit RC et environ égal à 500  $\mu$ s, (Johnson *et al.*, 2011; Kros and Crawford, 1990; Oliver *et al.*, 2006)) prévient le verrouillage de phase et le potentiel de récepteur suit l'enveloppe de la stimulation sonore (**figure 2.13**). Ainsi, au-delà de 1 à 2 kHz, le codage de la fréquence est assuré par la tonotopie.

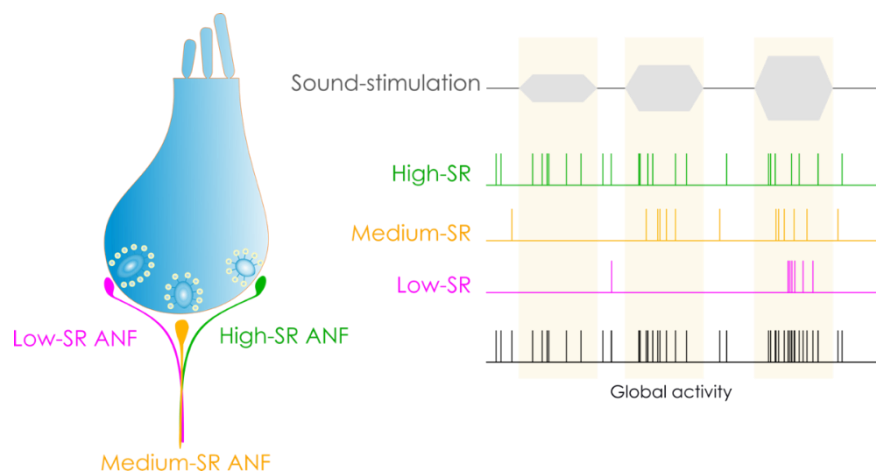


**Figure 2.13 : Verrouillage en phase des fibres du nerf auditif.** (A) Schéma de l'organe de Corti avec les électrodes d'enregistrements intracellulaires. (B) Enregistrement intracellulaire d'une fibre du nerf auditif en réponse à une stimulation sonore (Rose *et al.*, 1967). Les potentiels d'action sont émis à un moment préférentiel du cycle de l'onde sonore. (C) Potentiels de récepteur d'une CCI en réponse à des ondes sonores de fréquences différentes (en Hz). Au-delà de 1 kHz, la composante alternative diminue tandis que la composante continue augmente (Palmer and Russell, 1986).

## 2.4 Codage en intensité

### 2.4.1 Anatomie et fonction de l'innervation des cellules ciliées internes

Dans la cochlée, le codage de l'intensité repose sur le nombre de potentiels d'action émis par seconde par les fibres du nerf auditif en fonction de l'intensité sonore. Trois populations de fibres auditives innervent les CCI : les fibres à bas seuil qui répondent à des sons de faible intensité. Ces fibres ont une activité spontanée élevée (le nombre de potentiels d'action par seconde en absence de stimulation sonore est supérieur à 18 Hz), et leur dynamique de réponse est étroite (les fibres sont saturées dès 20 à 30 dB au-dessus du seuil). Les fibres à seuil moyen, avec une activité spontanée située entre 0,5 et 18 Hz et les fibres à haut seuil avec une activité spontanée inférieure à 0.5 Hz (Evans, 1972; Liberman, 1982; Petitpré et al., 2020). C'est le recrutement progressif de ces trois contingents de fibres auditives qui permet de coder une large dynamique d'intensité, allant du seuil de perception au seuil de la douleur (110 dB à 1000 Hz) (figure 2.14).



**Figure 2.14 : Codage de l'intensité sonore.** Les faibles intensités de stimulation recrutent les fibres dont l'activité spontanée est la plus haute mais qui saturent rapidement (en vert). Le recrutement progressif des autres contingents de fibres auditives (orange et rose, respectivement) à seuils plus élevés et avec peu de saturation permet le codage de l'intensité sur une grande dynamique. Schéma : Dr. Régis Nouvian.

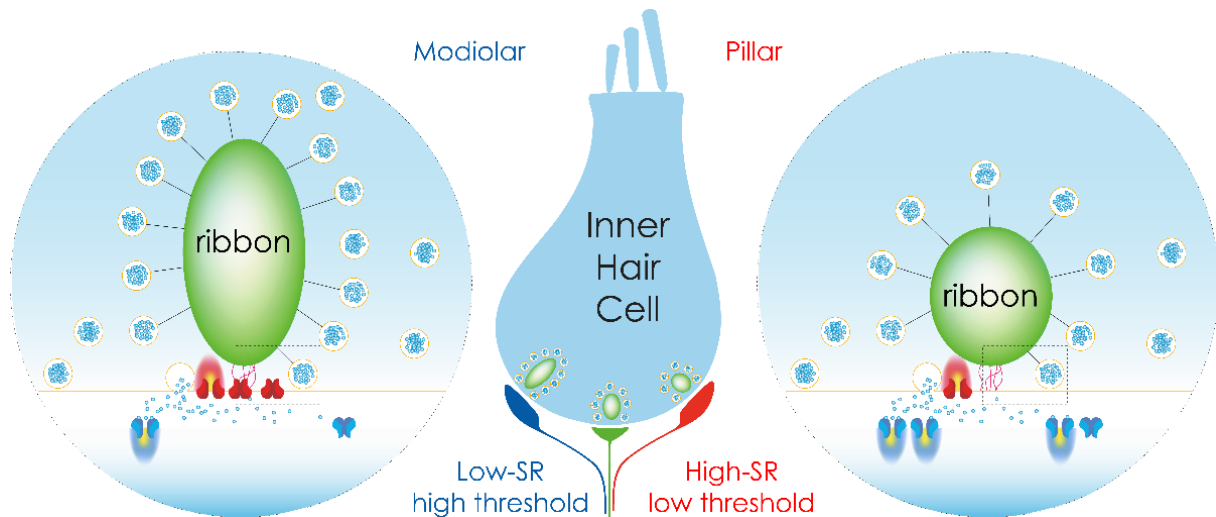
Si l'activité des fibres est dépendante de leur innervation par les fibres efférentes latérales et par l'expression de canaux ioniques, il semble que l'activité pré-synaptique détermine les propriétés des fibres du nerf auditif. Le marquage antérograde des fibres auditives dont l'activité avait été préalablement mesurée avant d'être suivie par la reconstruction en 3D de coupes sériées en microscopie électronique à transmission a démontré que les fibres à bas seuils innervent des synapses dont les rubans sont de petite taille et les densités post-synaptiques étendues (Lieberman, 1980). Ces fibres innervent préférentiellement la région des CCI proches des cellules du pilier de l'organe de Corti. A l'inverse, les fibres à haut seuil connectent de larges ou bien multiples rubans et leur densités post-synaptiques sont petites (Lieberman, 1980). Ces fibres projettent préférentiellement la région des CCI proches du modiulus. Ces données ont ensuite été confirmées en microscopie confocale à partir de l'immunomarquage de la protéine majoritaire du ruban synaptique, à savoir RIBEYE, et des récepteurs au glutamate post-synaptiques (Lieberman *et al.*, 2011). De plus, l'utilisation d'un peptide contenant le motif PXDLS, lui permettant de se lier à la protéine RIBEYE, conjuguée à un fluorophore a démontré une augmentation de la taille des rubans selon l'axe pilier-modiulus. L'immunomarquage des canaux calciques et l'utilisation d'une sonde calcique fluorescente a montré une augmentation du nombre de canaux calciques selon l'axe pilier-modiulus (Ohn *et al.*, 2016). Ces données semblent donc montrer une variabilité dans l'anatomie des synapses selon la nature des fibres auditives connectées.

En raison de leur rôle dans l'exocytose, les canaux calciques sont essentiels dans le codage sonore. Les courants calciques de type L (sensibles au potentiel) des CCI se caractérisent par des cinétiques d'activation rapides (100  $\mu$ s), une activation à des potentiels relativement négatifs (entre -60 et -50 mV) et par une absence d'inactivation (Koschak *et al.*, 2001; Moser and Beutner, 2000). L'hypothèse selon laquelle l'activité des canaux calciques est à l'origine

de la sensibilité des fibres du nerf auditif repose sur la mesure des influx calciques dans les synapses individuelles, qui montre une forte variabilité dans l'amplitude et dans la sensibilité au potentiel des influx calciques dans les synapses à ruban. Özçete et Moser ont montré que les synapses diffèrent dans leur dépendance au voltage selon qu'elles sont situées côté pilier ou modiolus de la cellule ciliée interne. Ils distinguent trois types de synapses : les synapses de type 1, qui comportent des canaux calciques présentant un couplage stimulation-sécrétion de type nanodomaine (uniquement quelques canaux calciques contrôlent l'exocytose des vésicules synaptiques) et sont sensibles à l'hyperpolarisation ; les synapses de type 3, qui comportent des canaux calciques présentant un couplage stimulation-sécrétion de type microdomaine (plusieurs canaux calciques contrôlent l'exocytose des vésicules synaptiques) et sont sensibles à la dépolarisation. Les synapses de type 2 présentent un fonctionnement intermédiaire. Les synapses localisées du côté pilier des CCI sont exclusivement de type 1 alors que les synapses localisées du côté modiolus des CCI présentent les trois types (localisées de manière randomisée sur le côté modiolus). De façon remarquable, ces auteurs démontrent un gradient de la sensibilité au voltage des synapses des CCI selon l'axe pilier-modiolus (Özçete and Moser, 2020).

Le profil transcriptomique des neurones du ganglion spiral (SGN) de type I a été établie chez la souris comprenant trois sous-types qui expriment des combinaisons uniques (Petitpré *et al.*, 2018; Shrestha *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018). Dans leur étude, Shrestha *et al.*, mettent également en évidence l'intérêt de l'activité développementale dans la configuration et distinction des 3 types de fibres. L'étude de la souris knock-out VGLUT3 montre qu'en l'absence d'une activité spontanée avant l'entrée en fonction de l'audition, la proportion des 3 types de fibres est perturbée, avec notamment une forte réduction des neurones type Ic et une large augmentation des neurones de type Ia. Le développement des sous-types de SGN de type I nécessite également que la mécanotransduction soit fonctionnelle durant la phase

développementale, avant l'entrée en fonction de l'audition. En son absence, l'activité spontanée est perturbée et la maturation des SGN et des circuits auditifs compromise (Sun *et al.*, 2018).



**Figure 2.15 : Hétérogénéité des synapses à rubans et conséquences physiologiques.** L'amplitude des influx calciques (ici en jaune-rouge) déterminerait l'activité spontanée des fibres du nerf auditif. Les fibres à basse activité spontanée à hauts seuils (bleu) se caractérisent par des densités post-synaptiques de surface réduite et sont connectées à des rubans synaptiques de grande taille. A l'inverse, les fibres à haute activité spontanée et à bas seuils (rouge) ont des densités post-synaptiques étendues et sont connectées à des rubans compacts de petite taille (Lieberman *et al.*, 2011). Cependant, l'hétérogénéité des influx calciques n'est pas distribuée selon un axe modiolus-pilier, à l'inverse de la forme des rubans, des surfaces des densités post-synaptiques et de l'activité des fibres du nerf auditif (Meyer *et al.*, 2009). Schéma : Dr. Régis Nouvian.

## 2.4.2 Anatomie et fonction de l'innervation des cellules ciliées externes

L'innervation afférente des CCE est assurée par les neurones ganglionnaires de type II (**Figure 2.8**). Ces derniers représentent une population minoritaire au sein du ganglion spiral : ils constituent en effet à peine 5 % de la population neuronale de cette structure (Spendlin, 1972). Les neurones de type II sont plus petits que les neurones de type I et contrairement à ces derniers, ils ne sont pas myélinisés. Le prolongement périphérique de ces neurones est ramifié. Chaque neurone de type II va ainsi établir des synapses avec une dizaine de CCE différentes, appartenant généralement à la même rangée (Barclay *et al.*, 2011; Zhang and Coate, 2017). La nature glutamatergique de ces synapses a été démontrée par l'enregistrement des terminaisons des fibres de type II et par l'expression des transporteurs du glutamate intravésiculaire VGLUT3 et VGLUT2 (Weisz *et al.*, 2009, 2021). En accord avec ces résultats, les CCE sont dotées de rubans présynaptiques (Knirsch *et al.*, 2007). Cependant, le rôle de l'innervation afférente des CCE reste controversé. Les neurones de type II ne semblent pas répondre aux stimulations sonores à forte intensité (Robertson, 1984), malgré une sensibilité à l'ATP (Weisz *et al.*, 2009), pouvant être libéré lors d'un traumatisme sonore (Gale *et al.*, 2004). En présence d'un dommage au niveau des cellules ciliées, de l'ATP est libéré par les cellules de soutien. L'ATP vient activer les récepteurs purinergiques (P2X, P2Y) présents sur les neurones afférents de type II et entraîne à la fois la fermeture de canaux potassiques KCNQ et l'excitation des fibres nerveuses de type II. Ainsi, un dommage cellulaire au niveau des cellules ciliées peut entraîner l'émission d'un message nerveux par les fibres afférentes de type II. Ces dernières pourraient donc médier les sensations auditives de douleurs (Flores *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015). En 2021, l'étude de la souris exprimant VGLUT3 uniquement dans les CCE montre que les fibres afférentes de type II seraient également capables de coder pour des sons d'intensité sonore modérée (85 dB SPL) et de traduire une certaine graduation de l'intensité sonore (Weisz *et al.*, 2021).



## 2.5 La voie auditive ascendante

Les caractéristiques physiques des sons (fréquence, durée et intensité) sont ensuite transmises au tronc cérébral où s'effectue le décodage de base du message. Après avoir transité dans les noyaux cochléaires, le complexe olivaire supérieur et le lemnisque latéral, le message arrive au niveau du colliculus inférieur. Ces structures sous-corticales jouent un rôle essentiel dans la localisation des sons (Spitzer and Semple, 1995; Syka, 1997). Dès ce niveau, des associations plus intégrées sont réalisées. Le lemnisque latéral assure la relation avec le système d'éveil comportemental (formation réticulée), et les interactions colliculus inférieur (centre auditif) - colliculus supérieur (centre visuel) permettent un traitement multisensoriel de l'information (Moore *et al.*, 2010). Un dernier relais avant le cortex est effectué dans le thalamus (corps genouillé médian). C'est dans ce relais que s'opère la préparation d'une réponse motrice (vocale par exemple). Les informations qui parviennent au cortex auditif primaire transitent vers les aires de Broca et de Wernicke, substrats anatomiques essentiels pour l'acquisition du langage (Bartlett, 2013).

## 3 . LA FERRITINE

Le fer est un élément primordial pour différents constituants du corps humain. Il est présent dans les composés héminiques, à hauteur de 70% dans l'hémoglobine, 3% dans la myoglobine (protéine musculaire) (Crichton, 1971) et dans différentes enzymes héminiques (telles que la cytochrome oxydase, les ribonucléotides réductases, les catalases, et la xanthine oxidase). Il est également présent dans des composés non héminiques, à hauteur de 25-30% tels que la transferrine, une protéine de transport du fer, l'hémosidérine et la ferritine qui sont tous deux des molécules de stockage de fer. Seulement une infime proportion de fer est présente sous forme libre dans l'organisme (<5%) du fait de sa haute capacité à générer des radicaux libres. Cette propriété de production de radicaux libres, pouvant conduire à d'importantes atteintes cellulaires, nécessite donc une régulation constante dans laquelle la ferritine vient jouer un rôle important.

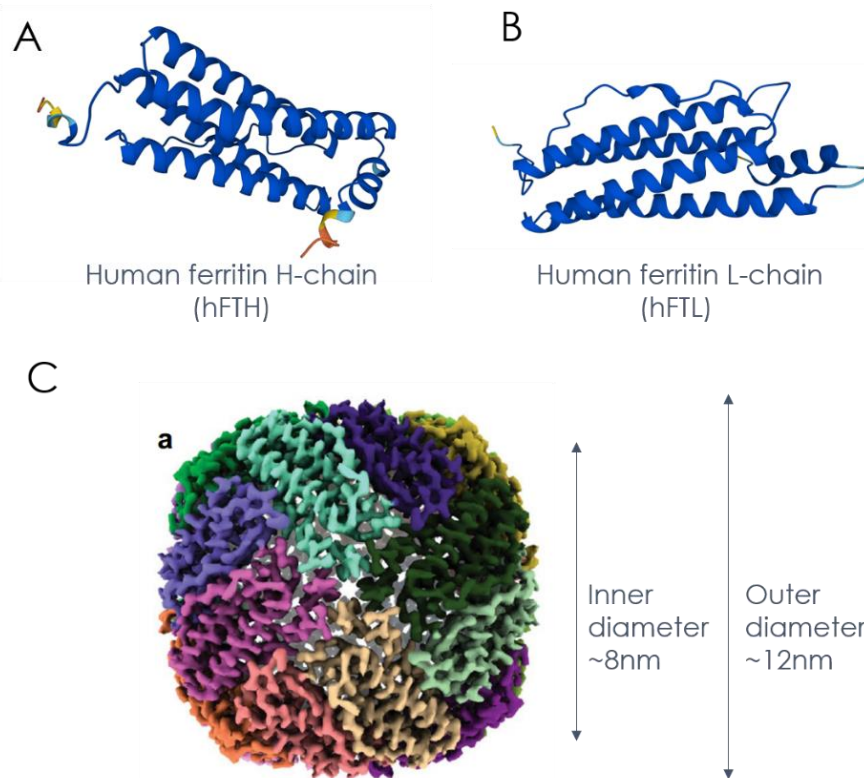
### 3.1 Composition et rôle de la ferritine

La ferritine est la principale protéine cellulaire dédiée au stockage du fer. Isolée et décrite pour la première fois en 1937 par Laufberger ([Sur la Cristallisation de la Ferritine. Bull.Soc. Chim. Bio. 19, 1575-1582, 1937](#)) elle joue un rôle essentiel dans l'homéostasie du fer. Elle module les niveaux de fer libre en stockant le fer pour mieux le redistribuer à sa propre cellule, aux autres cellules, ou bien pour les protéger du stress cellulaire lié à une accumulation de radicaux libres (ROS) (Crichton, 1971, 1990; Theil, 1987).

La ferritine est une protéine ubiquitaire, hautement conservée. Elle est majoritairement présente dans le cytoplasme des cellules et n'a été observée ni dans le noyau ni dans les organelles, exceptés les lysosomes (Iancu, 1992; Richter, 1978). La ferritine est composée d'un assemblage non-covalent de 24 sous-unités (480 kDa), formant l'apoferritine, une enveloppe de forme sphérique creuse de 12 nm de diamètre extérieur et 8 nm de diamètre intérieur, dans laquelle vient se stocker les atomes de fer dans de petites cristallites (Massover, 1993; Torti and

Torti, 2013). La spatialisation de la ferritine est faite de telle manière qu'elle peut stocker jusqu'à 4500 atomes de fer. Chez les vertébrés, la ferritine est composée par deux chaînes : la chaîne lourde (FTH) et la chaîne légère (FTL1). Les deux chaînes présentent 55% d'homologie (Drysdale, 1988) et sont situées sur des gènes différents : chez l'homme, le gène pour FTL1 est fixé sur le chromosome 19 et pour FTH, sur le chromosome 11 (Drysdale, 1988; Worwood *et al.*, 1985). Chez la souris, la chaîne légère de la ferritine est associée au chromosome 7 et la chaîne lourde au chromosome 19 (Rucker *et al.*, 1996).

Les deux chaînes détiennent des rôles différents. La chaîne lourde est dotée d'une activité enzymatique : elle catalyse l'oxydation du fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ). La chaîne légère, quant à elle, possède à la fois une fonction de stabilisation de la sphère et une fonction de stockage du  $\text{Fe}^{3+}$ , correspondant à la forme non soluble du fer. Il a été noté que les proportions de la chaîne légère et de la chaîne lourde diffèrent selon l'organe étudié : la chaîne légère est fortement présente dans la ferritine localisée dans le foie et la rate ; la chaîne lourde est fortement présente dans la ferritine localisée dans le cœur, les muscles squelettiques et les cellules cancéreuses (Cairo *et al.*, 1991; Muhoberac and Vidal, 2013; Wang *et al.*, 2010). Une ferritine mitochondriale (MtF) a été découverte chez l'homme (Levi *et al.*, 2001) et présente une structure et fonction similaire à la ferritine cytoplasmique (Levi and Arosio, 2004).



**Figure 3.1 : Structure de la ferritine.** La ferritine est une protéine de stockage de fer, située majoritairement dans le cytoplasme cellulaire. Elle est constituée par un assemblage de 24 sous-unités, formant une enveloppe sphérique dans laquelle viennent se stocker les atomes de fer sous leur forme ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (C). Elle est composée de deux sous-unités, la chaîne lourde de la ferritine (A) qui est le site de réaction de la ferroxidase, et la chaîne légère de la ferritine (B) dont le rôle principal est de stocker les atomes de fer  $\text{Fe}^{3+}$ . (A), (B) structures prédites par l'algorithme AlphaFold. (C) Figure adaptée de Irimia-Dominguez *et al.* (2020).

La ferritine joue un rôle important dans la captation et séquestration du fer. En son absence, on note un important stress oxydatif (Orino *et al.*, 2001), lié notamment à la libération de radicaux hydroxyles issus de la réaction de Fenton (Arosio and Levi, 2010). Cette dernière consiste en l'oxydation des ions de fer ferreux par du peroxyde d'hydrogène, entraînant la production de radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles :  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$ . Ainsi dans la réaction de Fenton, le fer va permettre de générer des radicaux superoxydes, dont les radicaux hydroxyles, la forme la plus nocive des radicaux libres. Le fer, en entraînant une production

importante de radicaux libres participe directement à la dégradation de l'ADN, des lipides et protéines pouvant conduire à la mort cellulaire. Un excès de fer intracellulaire peut ainsi être très toxique pour la cellule. La présence intracellulaire de la ferritine limite donc le stress oxydatif et participe au maintien cellulaire (Orino *et al.*, 2001).

## 3.2 Régulation de l'expression de la ferritine

Le nombre de ferritines cytoplasmiques est régulé par la traduction des ARNm de la ferritine, elle-même régulée par le taux de fer libre intracellulaire (Aziz and Munro, 1986; Rogers and Munro, 1987). Ce processus est médié par l'interaction entre les protéines de liaison à l'ARN, appelées IRP1 et IRP2, et une zone de la région 5' non traduite de l'ARNm de la chaîne H et L de ferritine, appelée « the iron responsive element » (IRE), qui présente une structure secondaire en forme de "tige-boucle" (Eisenstein, 2000; Haile *et al.*, 1989; Hentze *et al.*, 1987; Jaffrey *et al.*, 1993; Leibold and Munro, 1988; Thomson *et al.*, 1999). Il existe deux protéines de liaison à l'ARN, les protéines régulatrices du fer 1 et 2 (IRP1 et IRP2 respectivement, pour « iron regulatory protein 1 and 2 »). IRP1 existe sous deux configurations, dépendantes du taux de fer libre intracellulaire (Wilkinson and Pantopoulos, 2014). Lorsque la quantité de fer libre est faible, la protéine de liaison IRP1 adopte une configuration ouverte et peut se lier au site IRE, qui agit alors comme un répresseur de la traduction de la ferritine et entraîne donc une augmentation du taux de fer intracellulaire. A l'inverse, lorsque la quantité de fer libre est élevé, IRP1 existe sous la forme d'une aconitase cytosolique et ne se lie pas au site IRE. De même, en cas d'une anémie en fer, la protéine de liaison IRP2 est fortement exprimée et se lie au site IRE. Il y a alors inhibition de la traduction de l'ARNm, la formation de ferritine est réduite et le taux de fer libre s'élève. A l'inverse, dans le cas d'un excès de fer, IRP2 est rapidement dégradée par le ciblage d'une séquence unique de 73 acides aminés (Iwai *et al.*, 1998). Ainsi, lorsque

l'une des deux protéines de liaisons IRP1 et IRP2 se lie au site IRE, la traduction de l'ARNm est inhibée et la proportion de ferritine diminue à l'inverse du taux de fer libre (Torti and Torti, 2013). Bien que IRP1 et IRP2 possèdent toutes deux une spécificité similaire pour la liaison à l'IRE et qu'elles fonctionnent de manière similaire dans la traduction de l'ARNm, ces deux protéines sont régulées par le fer via des mécanismes différents. Un taux de fer libre élevé entraînera une traduction importante de l'ARNm de la chaîne L et H de la ferritine, et donc une augmentation du nombre de ferritines cytoplasmiques. A l'inverse, un faible taux de fer libre entraînera une diminution de la traduction des ARNm et une diminution du nombre de ferritines.

### 3.3 Maladies et mutations génétiques liées à la ferritine

Plusieurs maladies génétiques liées à la ferritine ont été découvertes. Parmi elles, deux sont des maladies autosomiques dominantes dues à une mutation sur la région 5' non traduite de l'ARNm de la chaîne lourde (H) et de la chaîne légère (L) de ferritine, appelée IRE. L'une d'elle est liée à une mutation sur l'IRE de l'ARNm de la chaîne L de la ferritine et provoque comme symptômes une hyperferritinémie, c'est-à-dire un taux anormalement élevé de ferritine dû à une surcharge en fer, et une cataracte (HHCS; OMIM 600886)(Beaumont *et al.*, 1995). La seconde est liée à une mutation sur l'IRE de la chaîne H ; elle entraîne une réduction du nombre de la chaîne lourde de la ferritine, montre les signes d'une hémochromatose associée à une surcharge en fer dans le sérum, un taux élevé de transferrine et une diminution du stockage du fer dans les ferritines malgré une augmentation de l'expression de la chaîne légère de cette dernière (Kato *et al.*, 2001).

D'autres mutations portant sur la chaîne légère de la ferritine ont également été rapportées (Kumar *et al.*, 2016; Yoon *et al.*, 2019) dont la plus répandue est la mutation 460InsA (Chinnery *et al.*, 2007). Appelée « neuroferritinopathy » ou « hereditary ferritinopathy » (HF) (MIM

606159) il s'agit d'une maladie autosomique dominante progressive débutant à l'âge adulte à pénétrance variable (Chinnery *et al.*, 2003, 2007; Cozzi *et al.*, 2013; Curtis *et al.*, 2001; Kubota *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2015; Muhoberac and Vidal, 2013; Vidal *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2019). Elle est caractérisée par des symptômes extrapyramidaux tels que la chorée, la dystonie ou le parkinsonisme et d'autres mouvements désordonnés, dont un syndrome des jambes sans repos, des troubles comportementaux et cognitifs. Au niveau pathologique, on note la présence de cavités kystiques dans les ganglions de la base, des corps d'inclusions de ferritine et des dépôts de fer importants dans le cerveau. Dans son étude de 2015, Li *et al.* suggèrent que les effets délétères causés par les sous-unités L mutantes sont dus à une perturbation de la structure des pores de la ferritine (l'effilochage de l'extrémité C des sous-unités L) plutôt qu'à une perte de fonction normale de la sous-unité L elle-même. Aucune indication d'une maladie liée à une mutation sur la chaîne lourde n'a été décrite, à ce jour. Il semble probable qu'une mutation à ce niveau soit létal (Ferreira *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2015).

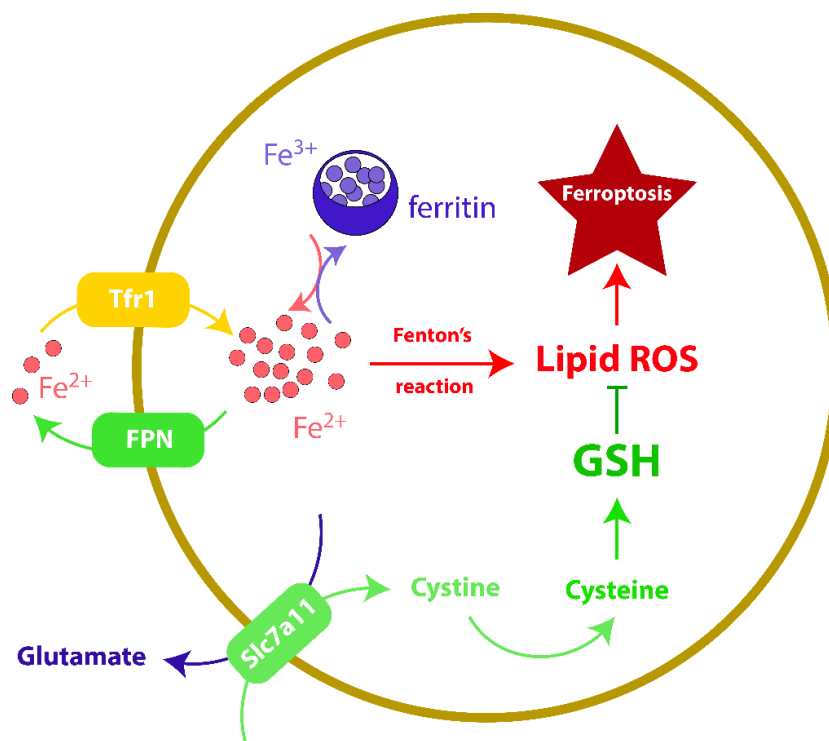
### 3.4 Mécanisme de mort cellulaire : la Ferroptose

En 2003, Dolma *et al.*, criblent un ensemble de composés chimiques pour leur capacité anticancéreuse vis-à-vis des cellules porteuses d'une mutation de l'oncogène *HRas* (HRas V12). Ils mettent alors en évidence une nouvelle forme de mort cellulaire, dont un inducteur chimique est l'érastine (Dolma *et al.*, 2003). Toutefois, ce n'est qu'en 2012 que ce mécanisme distinct de l'apoptose, de la nécrose et de l'autophagie sera décrit comme un programme de mort cellulaire à part entière, et désigné sous le terme « ferroptose » (Dixon *et al.*, 2012).

La ferroptose est un programme de mort cellulaire dépendante du fer, caractérisée par une accumulation de fer et de peroxydes lipidiques, entraînant une forte production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour « reactive oxygen species ») intracellulaires. Elle se distingue par un arrondissement de la cellule, une absence de modification de l'ADN nucléaire



et par la présence de mitochondries plus petites, denses aux électrons, mais présentant une activité normale (Dixon *et al.*, 2012). Une peroxydation massive des lipides membranaires a lieu, amenant à la mort cellulaire. L'induction de la ferroptose est dépendante notamment des facteurs qui conditionnent l'équilibre entre l'accumulation des lipides peroxydés et leur détoxification. Dans le système anti-oxydant dédié, l'enzyme GPX4 (glucoperoxydase 4) joue un rôle majeur dans l'inhibition de la peroxydation des phospholipides, autrement dit dans la détoxification des lipides peroxydés (Friedmann Angeli *et al.*, 2014; Imai *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2014). Pour fonctionner, la protéine GPX4 utilise du glutathion (GSH) dont l'approvisionnement est conditionné par le système Xc<sup>-</sup>, un antiporteur cystine/glutamate. Ainsi, la perte d'activité de l'enzyme GPX4 ou l'inhibition du système Xc<sup>-</sup> entraîne un déséquilibre dans la détoxification des lipides peroxydés et favorise le déclenchement de la ferroptose (Friedmann Angeli *et al.*, 2014; Imai *et al.*, 2017; Lei *et al.*, 2019; Seiler *et al.*, 2008; Yang and Stockwell, 2016; Yang *et al.*, 2014).



**Figure 3.1 : Processus biologique de la ferroptose.** La ferroptose est un programme de mort cellulaire dépendante du fer. Slc7a11 est un antiporteur cystine/glutamate qui en échange de cystine extracellulaire laisse sortir du glutamate. La cystine est transformée en cystéine qui forme avec le

glutamate du glutathion (GSH). L'enzyme GPX4 utilise ce GSH pour inhiber la peroxydation des lipides. En parallèle, la réaction de Fenton favorise la production de radicaux libres (ROS) à partir du fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) intracellulaire et issu de la ferritine. Un déséquilibre dans ce mécanisme peut entraîner une surproduction de ROS, favorisant ainsi la ferroptose et induisant la mort cellulaire.

Par ailleurs, certaines voies de signalisation intracellulaire et intercellulaire ainsi que le stress lié à l'environnement et les nutriments apportés peuvent influencer la ferroptose en régulant le métabolisme cellulaire et les niveaux de ROS. La ferroptose est impliquée dans de nombreux mécanismes. Son activation permet la destruction de certaines cellules cancéreuses et pourrait constituer une stratégie thérapeutique pour certaines formes de cancers (Jiang *et al.*, 2015, 2021; Yang *et al.*, 2014). A l'inverse, étant donné que la ferroptose entraîne une perte de cellules, son inhibition protège l'organisme contre des dommages ischémiques, des maladies cardiaques (Fang *et al.*, 2020), la transplantation cardiaque et la neurodégénérescence (Dixon *et al.*, 2012).

Ce mécanisme est intrinsèquement lié à l'homéostasie en fer de la cellule. Une augmentation du fer libre intracellulaire va entraîner une augmentation de la ferroptose et inversement, une diminution du fer libre entraînera une diminution de la ferroptose. De ce fait, la ferroptose est en partie dépendante des récepteurs IRP1 et IRP2, et à la régulation de la ferritine et de la transferrine (Feng *et al.*, 2020). Ainsi, la transferrine peut être considérée comme un marqueur de la ferroptose (Feng *et al.*, 2020) et la ferritine, une source de fer libre suite à sa dégradation par un processus autophagique appelé ferritinophagie (Gao *et al.*, 2016; Hou *et al.*, 2016).

### 3.5 Mécanismes moléculaires de l'homéostasie du fer

L'homéostasie du fer est permise par un contrôle strict de l'absorption du fer, qui a lieu dans le duodénum, et par son recyclage dans les macrophages, suite à la dégradation des globules rouges. Lors de l'absorption du fer, qui a lieu au pôle apical des entérocytes matures, la

réductase membranaire Dcytb effectue la réduction du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (McKie, 2008). Ce dernier est ensuite transféré au sein de l'entérocyte grâce au transporteur transmembranaire DMT1 (aussi appelé DCT1, NRAMP2, et SLC11A2) (Fleming *et al.*, 1997; Gunshin *et al.*, 1997). Les atomes ferreux sont ensuite relargués dans le plasma, via la ferroportine (également appelée IREG1 ou MTP1), située au pôle basal des entérocytes (Abboud and Haile, 2000; Donovan *et al.*, 2000; McKie *et al.*, 2000). Le  $\text{Fe}^{2+}$  subit alors une oxydation par l'héphaestine, située à la membrane plasmique, avant d'être pris en charge et transporté par la transferrine sous sa forme  $\text{Fe}^{3+}$ . Cependant, une partie du fer est conservé au sein des entérocytes et stocké au sein de la ferritine avant d'être éliminé lors de la desquamation des entérocytes. Au cours du processus de recyclage, les macrophages reconnaissent les globules rouges sénescents, les phagocytent et les digèrent. Lors de ce processus, l'hème-oxygénase catalyse la libération du fer, sous sa forme ferreuse, qui est par la suite soit stocké par la ferritine, soit relargué via la ferroportine, présente à la membrane plasmique des macrophages, pour être oxydée par la céruloplasmine puis pris en charge par la transferrine plasmatique (Hentze *et al.*, 2004).

L'hépcidine est une hormone peptidique sécrétée par le foie intervenant de manière prépondérante dans le contrôle de l'homéostasie du fer (Nicolas *et al.*, 2001). Pour réguler le taux de fer, l'hépcidine se lie à la ferroportine et induit son internalisation et sa dégradation (Nemeth *et al.*, 2004). Ainsi, en présence d'un taux de fer anormalement faible, l'hépcidine est fortement exprimée et induit une réduction du nombre de ferroportines exprimées à la membrane plasmique, réduisant ainsi la sortie cellulaire des atomes de fer (De Domenico *et al.*, 2007; Knutson *et al.*, 2005). Ainsi, la présence de ferroportine à la membrane plasmique des cellules est proportionnelle au taux de fer présent dans l'organisme.

Le fer, sous sa forme ferrique, est apporté aux cellules par fixation de la transferrine à son récepteur membranaire TfR1. L'activation du récepteur TfR1 va déclencher un phénomène

d'endocytose, conduisant à la formation d'un endosome où le fer ferrique est réduit sous sa forme ferreuse avant d'être libéré dans le cytoplasme par le transporteur DMT1 présent sur la paroi de l'endosome (Fleming *et al.*, 1997, 1998; Gunshin *et al.*, 1997; Ohgami *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces processus montrent que de nombreuses molécules participent ainsi à la métabolisation et au transport du fer au sein de l'organisme.

## 4 . MATERIEL ET METHODES

## 4.1 Animaux

Le soin et l'utilisation des animaux ont suivi le guide de bonne pratique de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm). Le protocole d'expérimentation a été approuvé par le Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche, il est enregistré auprès du Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale auprès du Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation sous la référence APAFIS#6235-201709141543234v6. Dans cette étude nous avons utilisé un modèle murin de fond génétique C57BL6J dont le gène codant FTL1 a été invalidé par recombinaison homologue (suppression des exons 1 et 2). Ce modèle a été développé au laboratoire du Professeur Ruben Vidal (Indiana University, School of Medicine, USA) et décrite dans la publication de (Li *et al.*, 2015). Pour cette étude, nous avons utilisés des souris knock-out (FTL1<sup>-/-</sup>), hétérozygotes (FTL1<sup>+/-</sup>) et sauvages (FTL1<sup>+/+</sup>) âgées de 15 jours à 5 mois, mâles et femelles inclus. L'ensemble des animaux utilisés pour ces études ont été hébergés dans des installations adaptées aux bons soins des animaux, sans agent pathogène, et accréditées par le ministère français de l'agriculture et de l'alimentation (34-172-36 ; 20 mai 2021). Ces animaux ont été élevés et maintenus dans un milieu sonore standard dans l'animalerie de l'institut des neurosciences de Montpellier (Inserm U1298) et ont été nourris et abreuvés ad libitum.

## 4.2 Génotypage

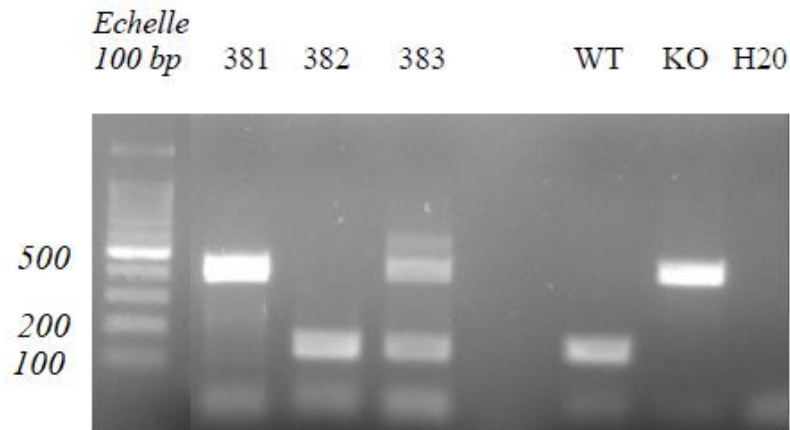
Le génotypage des souris a été effectué à partir de biopsies (phalanges ou extrémité de la queue) prélevés lors de l'identification. Dans un premier temps, l'ADN était extrait en utilisant un kit d'extraction (KAPA Express Extract Kit – KK7103, Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Les séquences spécifiques du gène *FTL1* étaient ensuite amplifiées par une Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) à l'aide d'un thermocycleur (Eppendorf 5341 Thermal Cycler AG 22331). Les amorces utilisées pour l'amplification étaient les suivantes : amorce sens 5' CCT-CAG-CTC-CGG-ATT-GGT 3' et anti-sens 5' GTT-CCG-TTC-AAA-CAC-TGT-TG 3' pour l'allèle sauvage et 5' GCA-CAG-GAA-AAG-TGG- GCA-CAG-T 3' pour l'allèle KO.

Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Elongation additionnelle
95°C	94°C	58°C	72°C	72°C
10 minutes	40 secondes	30 secondes	40 secondes	7 minutes
1 cycle	39 cycles			1 cycle

**Tableau 4.1 : Etapes de la Réaction de Polymérisation en Chaîne dans le cadre du génotypage de la lignée murine FTL1.**

A la fin de l'amplification, dont les différentes étapes sont indiquées dans le **tableau 4.1**, les produits de PCR étaient répartis dans les puits d'un gel d'agarose à 2% (ClearSight DNA Stain, Euromedex, Souffelweyersheim, France). Après migration par électrophorèse à 135 mV pendant 24 minutes, les amplicons étaient révélés par exposition aux UV. Les fragments d'ADN amplifiés présentant un poids moléculaire de 500 paires de bases (pb) indiquaient un génotype homozygote *FTL1*<sup>-/-</sup>, les fragments d'ADN amplifiés avec un poids moléculaire de 180 paires de bases (pb) correspondaient à un génotype sauvage *FTL1*<sup>+/+</sup>. Si les

fragments présentait les deux bandes, cela révélait la présence d'un individu hétérozygote  $FTL1^{+/-}$ .



**Figure 4.1 : Exemple du résultat de génotypage du 04.01.2021.** Visualisation des fragments d'ADN amplifiés par PCR. Les amplicons visibles uniquement à 200 pb et 500 pb correspondaient respectivement au génotype de souris sauvages  $FTL1^{+/+}$  et homozygotes  $FTL1^{-/-}$ . Les amplicons visibles à la fois à 200 pb et 500 pb correspondaient au génotype d'une souris hétérozygote  $FTL1^{+/-}$ .

## 4.3 Exploration fonctionnelle

### 4.3.1 Anesthésie des animaux

Les souris étaient anesthésiées avec un mélange de Zoletil 100 (40mg/kg) et de Rompun 2% (3mg/kg) dilué dans une solution de NaCl. Une injection intra-péritonéale, adaptée en fonction du poids de l'animal, était administrée pour endormir l'animal. Par la suite, des injections en sous-cutanée au niveau dorsal étaient administrées jusqu'à 20% de la dose initiale pour maintenir l'animal sous anesthésie durant l'intégralité des enregistrements. Tout au long des mesures, la température corporelle de l'animal était maintenue à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  grâce à une couverture chauffante (Homeothermic Blanket Systems, Harvard Apparatus) rétrocontrôlée à l'aide d'une sonde rectale.



### 4.3.2 Potentiels évoqués auditifs

La mesure des potentiels évoqués auditifs est une méthode utilisée pour déterminer l'activité neurale de la voie auditive ascendante, en réponse à une stimulation sonore. L'enregistrement des potentiels évoqués auditifs précoces (PEA) a été réalisé dans une chambre insonorisée, anéchoïque et faradisée. Après vérification de l'absence de réflexes chez la souris, des électrodes sous-cutanées étaient positionnées au niveau du vertex (électrode positive), de l'oreille testée (électrode de référence) et de la patte arrière opposée (masse). Un haut-parleur (JBL Incorporated Northridge model 2426H) placé à 10 cm de l'oreille, délivrait en champ libre des bouffées tonales ayant une enveloppe trapézoïdale (1 ms de montée et de descente, 9 ms de plateau suivi de 39 ms de silence ; cycle total 49 ms) aux fréquences suivantes : 4, 8, 11.3, 16, 22.6 et 32 kHz. L'intensité des stimulations sonores variait entre 10 et 80dB SPL par pas de 5dB. Les stimulations étaient présentées de manière aléatoire. Les signaux recueillis étaient amplifiés (gain de 20 000), échantillonnés (fréquence d'échantillonnage : 50kHz), filtrés (filtre passe-bande 0,3 à 3kHz) puis moyennés à partir de 650 itérations effectuées pour chaque niveau sonore de stimulation. La génération des stimuli et l'acquisition des données ont été réalisées grâce à une carte d'acquisition NI PXI e-1073 (National Instruments, Austin, Texas, USA) et au logiciel LabVIEW (National Instruments, Austin, Texas, USA). Les données générées étaient ensuite traitées à l'aide du logiciel MATLAB (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) et Igor (Wavemetrics, Oregon, USA). Le critère de seuil auditif était défini comme étant la plus petite pression acoustique nécessaire pour évoquer une réponse mesurable.

### 4.3.3 Produits de distorsion des émissions oto-acoustiques

Les produits de distorsion acoustique reflètent la non-linéarité de la cochlée (Kemp, 1978) et permettent de contrôler l'intégrité des cellules ciliées externes. En réponse à une stimulation sonore, l'activité amplificatrice des CCE entraîne une libération d'énergie dont une fraction se propage vers l'oreille moyenne, provoquant la mise en mouvement de la chaîne tympano-ossiculaire et la génération dans le conduit auditif externe d'émissions oto-acoustiques. Ces dernières peuvent être alors mesurées à l'aide d'un microphone. Cette technique est utilisée en France de manière systématique dans le cadre du dépistage auditif néonatal, depuis 2012. Dans nos expériences, une sonde 3-canaux (ER-10C S/N 2528, EtymoticResearch, USA) comportant un microphone et deux haut-parleurs était positionnée à l'entrée du conduit auditif externe de l'animal. Deux sons purs de fréquence  $f_1$  et  $f_2$  étaient émis simultanément, avec un rapport constant  $f_1/f_2$  égal à 1,2 et  $f_2$  situé entre 2 et 20kHz. La fréquence  $f_2$  était présentée de manière décroissante et chaque fréquence de stimulation était espacée d'un quart d'octave. Toutes les stimulations sonores étaient émises à 65dB SPL. Les données étaient ensuite recueillies et analysées grâce au logiciel CUBeDIS (Mimosa Acoustics, Mountainside, USA). La sonde était auto-calibrée avant chaque enregistrement, permettant de contrôler l'étanchéité du système et le bruit de fond environnant.

### 4.3.4 Mesure du potentiel endocochléaire

Une microélectrode de verre remplie d'une solution conductrice de KCl à 3M pouvait être introduite directement dans la rampe médiane afin d'enregistrer le potentiel endocochléaire. La microélectrode d'enregistrement et son portoir étaient reliés à un abaisseur d'impédance (WPI, modèle KS-700). Une macroélectrode en chlorure d'argent servant de référence était suturée dans la musculature du cou de l'animal. Lorsque la microélectrode d'enregistrement était

positionnée en surface de la strie vasculaire, la valeur du potentiel enregistrée était systématiquement compensée et ramenée à 0. La valeur du potentiel endocochléaire était directement mesurée en mV lorsque la pointe de la microélectrode, après avoir traversé la strie vasculaire, se trouvait dans le compartiment endolymphatique.

#### 4.3.5 Patch-clamp

Après le sacrifice des souris, les cochlées étaient rapidement prélevées et placées dans une solution de dissection à 4°C. La composition de la solution de dissection (en mM) était la suivante : 141,7 NaCl; 5,36 KCl; 0.1 CaCl<sub>2</sub> ;1 MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O; 0,5 MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O ; 10 HEPES et 10 glucose. Le pH était ajusté à 7,4 avec du NaOH à 1 N et l'osmolarité finale était comprise entre 290 et 310 mosmol.kg<sup>-1</sup>. A l'aide d'une loupe binoculaire et de pinces, la capsule otique était délicatement retirée afin d'accéder à l'organe de Corti. La partie apicale de l'organe de Corti était prélevée et transférée dans une chambre, remplie avec la solution de Ringer modifiée dont la composition était la suivante (en mM) : 2,8 KCl; 105 NaCl; 1 MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O; 10 HEPES ; 35 TEA-Cl ; 2 CaCl<sub>2</sub>; 1 CsCl et 10 glucose. Le pH était ajusté à 7,4 avec du NaOH à 1 N et l'osmolarité finale était comprise entre 290 et 310 mosmol.kg<sup>-1</sup>. La chambre était placée sous un microscope droit (Axio Examiner.A1, Zeiss). A l'aide d'une pipette de verre contrôlé par un micromanipulateur (PatchStar, Scientifica), la membrane tectoriale, les cellules ciliées externes, les cellules du pilier et les cellules phalangiennes étaient enlevées afin d'accéder aux cellules ciliées internes. Les pipettes de verre utilisées pour la mesure des courants calciques ont été obtenues par l'étirement de capillaires de verre en borosilicate (Kwik Fil, WPI) à l'aide d'une étireuse verticale PIP6 (HEKA). Les pipettes ont été préalablement recouvertes à leurs extrémités d'un polymère hydrophobe non conducteur (Sylgard, Dow Corning, Midland, USA), afin de réduire l'accumulation de charges le long de la paroi de verre. La composition de la

solution interne est la suivante (en mM) : 135 L-Acide glutamique; 10 TEA-Cl ; 10 4-AP ; 1 MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O ; 10 HEPES ; 2 Mg-ATP ; 0.3 Na-GTP. Le pH est ajusté à 7,2 avec du CsOH et l'osmolarité finale était comprise entre 290 et 310 mosmol.kg<sup>-1</sup>. La résistance des pipettes se situe entre 4 à 6 MΩ. Les cellules ciliées internes étaient « patchées » à température ambiante (20-25°C). Pour ce faire, la micropipette, dont la pointe avait une dimension d'environ 1 à 2 μm était apposée contre la membrane plasmique de la cellule. Une pression positive préalablement appliquée à l'intérieur de la pipette facilitait l'accolement entre la membrane et la pipette. En effet, la chute brutale de la surpression suivie par une dépression permettait d'obtenir un scellement étroit entre les parois de la pipette et la membrane cellulaire. Ce contact étroit entre la pipette et la membrane était reflétée par une valeur de résistance pipette supérieure ou égale à 1 GOhm. Une fois le giga-seal atteint, une nouvelle légère aspiration permettait de rompre la membrane sous la pipette et d'être en configuration cellule-entière. Cette configuration permettait l'enregistrement de la somme des courants membranaires traversant la cellule (courants macroscopiques). Les courants calciques des cellules ciliées internes ont été mesurés en réponse à des sauts de potentiels dépolarisants de -117 mV à +48 mV, par pas de 5 mV, d'une durée de 10 ms et à partir d'un potentiel de maintien de -87 mV. Les enregistrements ont été réalisés à l'aide d'un amplificateur opérationnel EPC10 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Allemagne) contrôlé par le logiciel PatchMaster (HEKA Elektronik). Les courants étaient filtrés avec un filtre passe-bas de 5 kHz et échantillonnés à une fréquence de 40 kHz. Les courants de fuite étaient soustraits par le protocole P/10. Tous les agents chimiques utilisés au cours de ces expériences provenaient de chez Sigma (St. Louis, MO, USA). Toutes les analyses ont été faites avec le logiciel Igor (Wavemetrics, Portland, Oregon, USA).

## 4.4 Observations anatomiques : Microscopie photonique

### 4.4.1 Immunofluorescence

Après l'euthanasie des souris, les cochlées étaient prélevées puis fixées pendant 15 min dans une solution de paraformaldehyde dilué à 4% dans du tampon phosphate salin (PBS ; 0.1 M ; pH 7.4). Les cochlées étaient ensuite rincées trois fois pendant 10 min avec la solution PBS 1X. Les dissections ont ensuite été effectuées dans du tampon PBS. A l'aide de forceps, la capsule otique, le ligament spiral, la strie vasculaire, la membrane de Reissner et la membrane tectoriale étaient retirées. Une fois les microdissections effectuées, les échantillons étaient ensuite placés dans une solution de perméabilisation (3% de Triton X-100 dans du PBS 1X) durant 30 minutes avant d'être transférés dans un tampon de blocage (10% de sérum de chèvre, 0,3% de Triton X-100 dans du PBS 1X) pendant 30 minutes. Les échantillons étaient ensuite incubés pendant une nuit à 4°C dans une solution contenant les anticorps primaires (1% de sérum de chèvre, 0,1% de Triton X-100). Les anticorps primaires utilisés et leurs dilutions respectives sont décrits dans le **tableau 4.2**. Après une nuit à 4°C, les échantillons étaient lavés 5 fois pendant 10 minutes dans du tampon de lavage (0.1% Triton X-100 dans le PBS) puis incubés pendant 2 h à température ambiante à l'abri de la lumière dans la solution d'incubation contenant les anticorps secondaires. Les anticorps secondaires utilisés sont décrits dans le **tableau 4.3**. Les anticorps secondaires issus du fabricant Abberior étaient spécifiquement utilisés pour les échantillons soumis à la microscopie super-résolutive STED (pour *stimulation emission-depletion*). Après 2h d'incubation, les échantillons étaient finalement rincés 5 fois pendant 10 minutes dans le tampon de lavage et montés entre lame et lamelle dans une solution de montage (Dako Fluorescence Mounting Medium, Réf : 53023). Les échantillons sont conservés à l'abri de la lumière et à 4°C avant d'être examinés avec le microscope confocal Zeiss LSM880 (Carl

Zeiss Microscopy GmbH, Germany) et le microscope STED super-resolution Abberior, du laboratoire Montpellier RIO Imaging (Montpellier, France). Les images ont été traitées et analysées avec les logiciels ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), Inspector (Abberior Instruments, Germany) et Zen Blue (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany).

Antigène	Espèce	Concentration	Fournisseur	RRID <i>Isotope</i>
<b>CtBP2</b>	Mouse	1 : 1000	BD Biosciences	AB_399431 <i>Isotope IgG1</i>
<b>VGLUT3</b>	Guinea Pig	1 : 300	Synaptic System	AB_2619825 <i>Isotope IgGp</i>
<b>FTL1 – polyclonal</b>	Rabbit	1 : 500	Abcam	AB_1523609 <i>Isotope IgG</i>
<b>FTL1 – monoclonal</b>	Rabbit	1 : 500	Invitrogen	AB_2810032 <i>Isotope IgG</i>
<b>FTH monoclonal</b>	Rabbit	1 : 500	Invitrogen	AB_2898990 <i>Isotope IgG</i>
<b>Cav1.3</b>	Rabbit	1 : 500	Almone labs	AB_2039775 <i>Isotope IgG</i>
<b>Homer1</b>	Rabbit	1 : 300	Merck Milipore	AB_11203298 <i>Isotope IgG</i>

**Tableau 4.2 : Liste des anticorps utilisés pour les marquages immunofluorescents des explants de cochlées.**

Conjugaison	Anticorps secondaire	Dilution	Fournisseur	RRID	Microscopie
<b>Alexa 488</b>	Anti-guinea pig	1 :1000	Invitrogen	AB_2534117	Confocale
<b>Alexa 568</b>	Anti-mouse	1 :1000	Invitrogen	AB_2535764	Confocale
<b>Alexa 647</b>	Anti-rabbit	1 : 1000	Invitrogen	AB_2535812	Confocale
<b>STAR RED</b>	Anti-mouse	1 :200	Abberior	STRED-1001-500UG	Confocale/STED
<b>STAR 580</b>	Anti-rabbit	1 : 200	Abberior	STR580-1002-500UG	Confocale/STED

**Tableau 4.3 : Liste des anticorps secondaires utilisés pour les marquages immunofluorescents des explants de cochlées.**

#### 4.4.2 Microscopie confocale

L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (Zeiss LSM880). Pour le comptage des densités pré- et post-synaptiques les acquisitions ont été effectuées à un grossissement 63x (objectif : 63X 1.4 Oil), représentant environ 12 cellules ciliées internes par image. Le pôle basal des CCI était entièrement numérisé par pas de 0,15  $\mu\text{m}$  en Z, le segment s'étendant du faisceau spiral interne au-dessous des CCI jusqu'au-dessus du dernier ruban synaptique visible, dans la partie apicale des CCI. Les séquences d'images obtenues étaient ensuite importées dans le logiciel de traitement Image J, pour effectuer une projection 2D (superposition de tous les plans optiques). Sur chaque projection 2D, le nombre total de rubans synaptiques étaient comptabilisés et la moyenne obtenue en divisant par le nombre de CCI présentes. Le nombre de synapses a été compté à partir de la superposition des immunomarquages des rubans synaptiques et de la densité post-synaptique, et la moyenne obtenue en divisant par le nombre de CCI présentes.

#### 4.4.3 Microscopie STED

L'acquisition des images a été effectuée à l'aide d'un microscope STED super-resolution Abberior. Les lasers délivraient un faisceau de longueur d'onde d'excitation de 561 nm et 640 nm, et une longueur d'onde de déplétion de 775 nm. Lors des acquisitions, le grossissement était 100x (objectif : 100X Plan SuperApochromat 1.4 Oil) et permettait de focaliser sur le pôle baso-latérale de 1 à 3 cellules ciliées internes. La taille du pixel xy était fixée à 30 nm et la taille du Z à 50nm (3D-STED). Le segment d'observation s'étendait sur un intervalle de 900 nm à 1,2  $\mu\text{m}$ , selon l'échantillon analysé. Les séquences d'images étaient ensuite importées dans le logiciel de traitement ImageJ, afin d'effectuer une projection 2D. A partir de ces projections 2D, les images étaient ensuite traitées à l'aide d'un script Matlab afin de mesurer la taille de

chaque ruban synaptique sur son axe long et court. A partir des mesures individuelles la surface elliptique de chaque ruban a été calculé en utilisant la formule suivante :  $s = \pi \frac{ab}{4}$ , avec « s », la surface elliptique, « a » la longueur de l'axe court et « b » la longueur de l'axe long. La distribution des mesures individuelles de surface elliptique ainsi que la distribution cumulative ont ensuite été représentées.

## 4.5 Observations anatomiques : Microscopie Electronique

### 4.5.1 Microscopie électronique à balayage

A la fin de l'évaluation fonctionnelle, les cochlées étaient rapidement prélevées dans une solution tampon phosphate saline (PBS ; 0.1M ; pH 7.4) puis fixées pendant 2 h à température ambiante dans du glutaraldéhyde 2,5% dilué dans du tampon phosphate salin (0.1 M ; pH 7.4). Les cochlées étaient ensuite rincées trois fois 10 minutes dans la solution tampon phosphate. Les cochlées étaient disséquées à l'aide de fines pinces afin d'ôter la capsule otique, le ligament spiral, la strie vasculaire, la membrane de Reissner et la membrane tectoriale. Les cochlées étaient déshydratées par des bains d'alcool successifs de 30 minutes et de concentration croissante : 15% - 30% - 40% - 50% - 60% - 70% - 80% - 90% - 100%. Les cochlées étaient ensuite maintenues dans un bain à 100% ETOH à 4°C toute une nuit. Le lendemain, la déshydratation est menée à terme en réalisant un point critique au CO<sub>2</sub> liquide à l'aide d'un appareil Bal-tec CPD 030 (critical point dryer). Les échantillons étaient ensuite collés sur des supports métalliques à l'aide d'une colle argentique, avant d'être recouverts par une fine couche d'or (10nm) dans un évaporateur cathodique (Sputter coater, Polaron SC500). Les échantillons étaient ensuite conservés dans une chambre sous vide. Les acquisitions ont été effectuées avec



un microscope électronique à balayage Hitachi S4000, sur la plateforme COMET de l'Institut des Neurosciences de Montpellier. Les observations pour le comptage des cellules sensorielles ont été effectuées en partant de l'extrémité apical vers l'extrémité basale, à un grossissement 1000x. Les observations des tours apicaux-médians permettaient d'estimer les atteintes des cellules sensorielles sur la plage fréquentielle allant du 4kHz au 32kHz (Müller *et al.*, 2005). Le comptage a permis d'identifier et de séparer les cellules ciliées présentant des stéréocils avec défauts morphologiques (i.e., fusion des cils, touffe ciliaire désorganisée), de celles présentant une absence de stéréocils et les cellules ciliées normales.

#### 4.5.2 Microscopie électronique à transmission

Suite au sacrifice des souris, les cochlées étaient prélevées et fixées rapidement dans une solution tampon PHEM (0.1 M ; pH 7.4) contenant du glutaraldéhyde 2,5% et du paraformaldéhyde 4%. Les cochlées étaient fixées durant 2h à température ambiante puis une nuit à 4°C. Les cochlées étaient ensuite rincées 3 fois 10 minutes dans du tampon PHEM (0.1 M ; pH 7.4) avant d'être mise à décalcifier durant 48 h à 4°C dans une solution d'EDTA 10% en PBS 1X. Après vérification de la décalcification, les cochlées étaient déshydratées dans des bains d'alcool de concentration croissante (30% à 100%) puis enrobées dans une résine époxy (EMBed 812) polymérisée à 60° pendant 36 h. Les cochlées incluses dans des blocs de résine étaient ensuite coupées à l'aide d'une lame de scalpel selon des plans précis. Tout d'abord, une première coupe dans l'axe verticale du modiolus était effectué, séparant la cochlée en deux parties. Chaque pan était ensuite basculé selon un angle de 90 degrés, afin de venir découper chaque demi-bloc en 3 parties, correspondant à la séparation du tour apical, du tour médian et du tour basal. Chaque bloc correspondant à un tour était retourné de 90 degrés, afin d'obtenir des coupes des cellules ciliées dans le plan sagittal. Cette technique, décrite de manière

approfondie dans (Spoendlin and Brun, 1974) permet de sélectionner des portions spécifiques de l'organe de Corti à différents niveaux entre l'apex et la base. Chaque échantillon était ensuite collé sur un support en résine, pour obtenir des coupes semi-fines (1  $\mu\text{m}$ ) et ultra-fines (70 à 100 nm). Les coupes semi-fines étaient effectuées à l'aide d'un ultramicrotome (Reichert, Ultracut S. Leica) et d'un couteau en diamant. Elles étaient recueillies sur des lames de verre, colorées au bleu de toluidine et examinées en microscope optique Nanozoomer 1 Hamamatsu, à un grossissement x40, sur le plateau MRI de l'Institut des Neurosciences de Montpellier. Les coupes ultra-fines étaient effectuées à l'aide d'un ultramicrotome (Reichert, Ultracut S Leica). Deux à trois coupes espacées de 70 nm sont réalisées sur chaque bloc, et cela à différents niveaux dans le tissu. Ces coupes ultra-fines sont alors collectées sur des grilles de cuivre puis contrastées avec de l'acétate d'uranyle 1.5% dans l'éthanol 70% et une solution de citrate de plomb (Reynolds, 1963) et observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Tecnai F20 à 80KV équipé d'une caméra numérique Veleta, sur la plateforme COMET de l'Institut des Neurosciences de Montpellier.

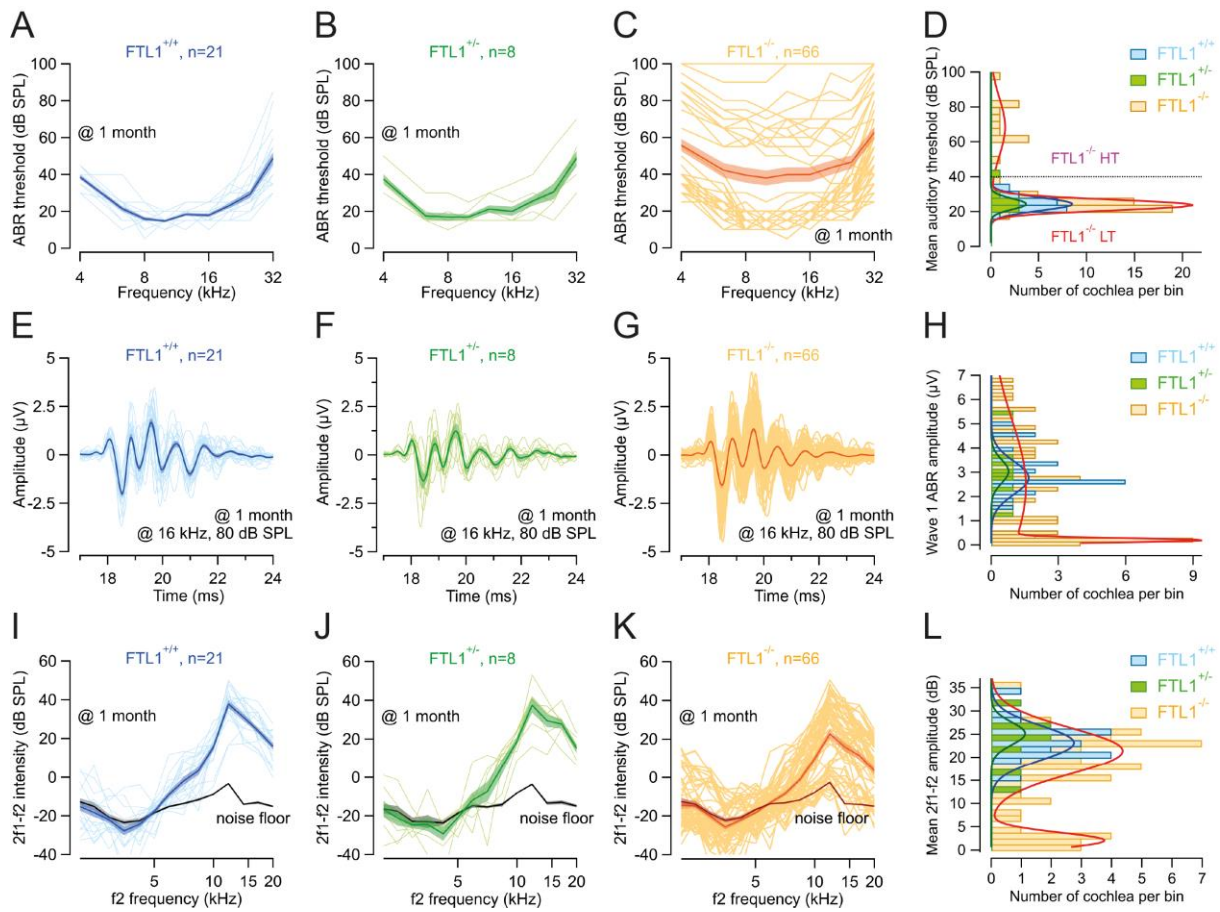
## 5 . RESULTATS

## 5.1 Exploration fonctionnelle des souris FTL1<sup>-/-</sup>

### 5.1.1 Atteinte auditive dans une fraction de souris FTL1<sup>-/-</sup>

Nous avons dans un premier temps déterminé le fonctionnement de la voie auditive chez les souris dont le gène codant la chaîne légère de la ferritine (FTL1) a été invalidé par recombinaison homologue. Pour cela, nous avons mesuré les seuils auditifs des souris FTL1<sup>+/+</sup>, FTL1<sup>+/-</sup> et FTL1<sup>-/-</sup> âgées d'un mois à partir de leurs potentiels évoqués auditifs (PEA) (**figure 5.1**). Ces derniers reflètent l'activité synchrone des relais le long de la voie auditive ascendante. Les seuils auditifs sont similaires entre les souris FTL1<sup>+/+</sup> et FTL1<sup>+/-</sup> (**figure 5.1A, B**) avec des seuils auditifs moyens situés à  $25,34 \pm 0,94$  dB SPL et  $26,11 \pm 2,23$  dB SPL respectivement. En revanche, les réponses obtenues pour les souris FTL1<sup>-/-</sup> sont très variables avec un contingent de souris dont les seuils auditifs sont comparables aux souris FTL1<sup>+/+</sup> et FTL1<sup>+/-</sup> et une autre fraction de souris aux seuils auditifs élevés sur l'ensemble des fréquences testées (**figure 5.1C**). Tandis que les histogrammes de distribution des seuils auditifs moyens des souris FTL1<sup>+/+</sup> et FTL1<sup>+/-</sup> suivent une distribution gaussienne à un seul mode (**figure 5.1D**), celui des souris FTL1<sup>-/-</sup> suit une distribution gaussienne à deux modes suggérant deux phénotypes distincts, à savoir des souris à bas seuils auditifs (FTL1<sup>-/-</sup> LT pour *low-threshold*) et des souris à hauts seuils (FTL1<sup>-/-</sup> HT pour *high-threshold*) (**figure 5.1D**). Parmi les souris FTL1<sup>-/-</sup> HT, certains individus présentent une surdité complète, à savoir une absence de réponse aux fortes intensités de stimulations sonores (100 dB SPL) sur l'ensemble des fréquences testées. De la même façon, l'étude de l'amplitude de la première onde des PEA montre qu'une fraction de souris FTL1<sup>-/-</sup> présente une amplitude comparable à celle des souris FTL1<sup>+/+</sup> et FTL1<sup>+/-</sup> tandis qu'une autre fraction de souris se distingue par des PEA de faible amplitude (**figure 5.1E, F et G**). Ici encore, les histogrammes de distribution des PEA des souris FTL1<sup>+/+</sup> et FTL1<sup>+/-</sup> peuvent être reproduits

par une distribution gaussienne uni-modale tandis que celui des souris  $FTL1^{-/-}$  suit une distribution gaussienne à deux modes (**figure 5.1H**).

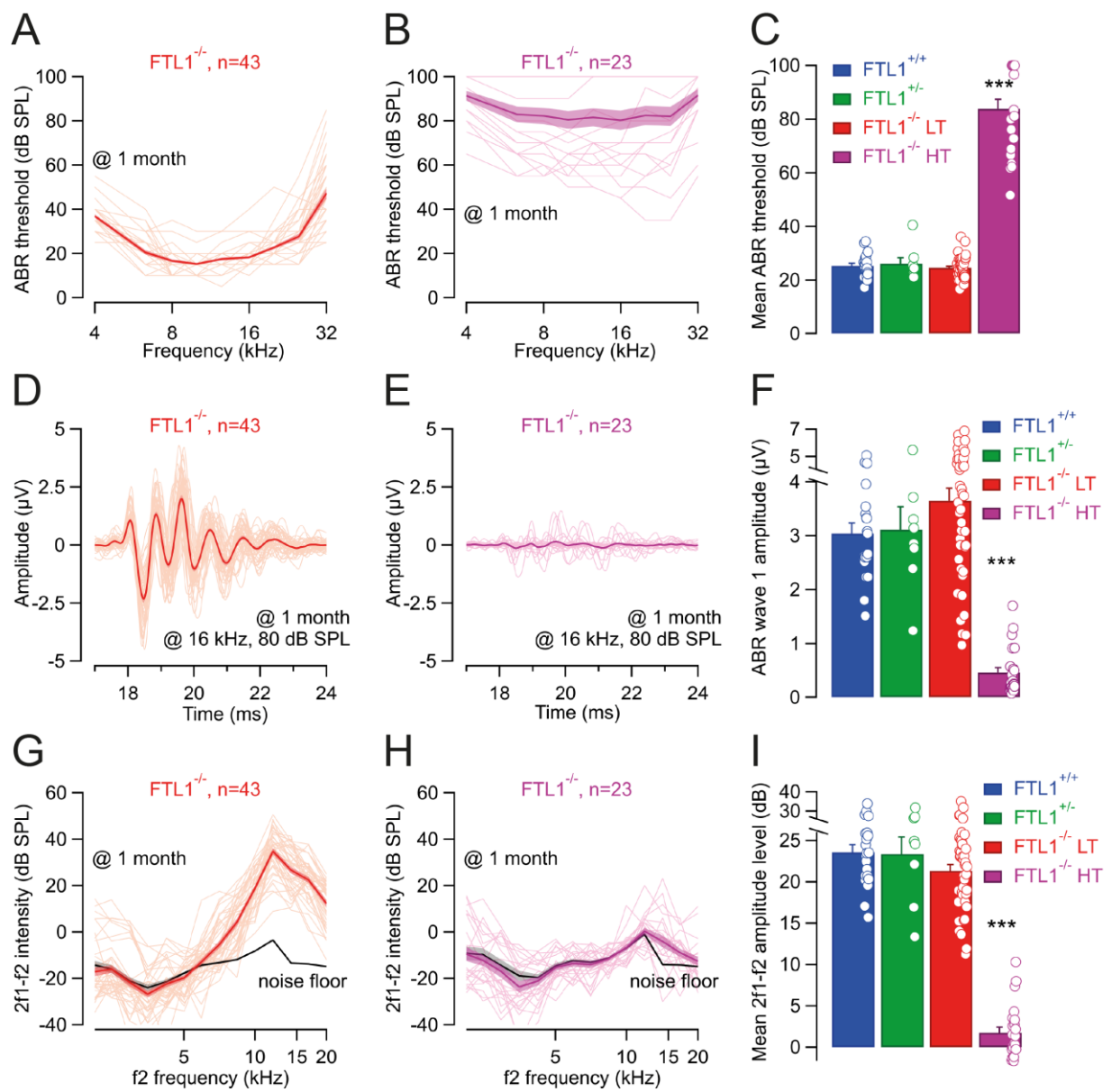


**Figure 5.1 : Exploration fonctionnelle de l'audition chez les souris  $FTL1^{-/-}$ .** (A-C) Audiogrammes, (E-G) PEA et (I-K) amplitude du produit de distorsions des émissions otoacoustiques (PDEOA)  $2f_1-f_2$  représentée en fonction de la fréquence  $f_2$  chez les souris contrôles ( $FTL1^{+/+}$ , bleu, A, E et I), hétérozygotes ( $FTL1^{+/-}$ , vert, B, F et J) et knock-out ( $FTL1^{-/-}$ , orange, C, G, K). Les lignes fines indiquent les mesures individuelles et les lignes épaisses la moyenne  $\pm$  l'erreur standard. (D, H, L) Histogrammes de la distribution des audiogrammes (D), PEA (H) et PDEOAs (L) présentés en (A-C), (E-G) et (I-K) respectivement. L'histogramme de distribution des seuils auditifs permet de séparer deux populations de souris homozygotes knock-out ; les souris à bas seuils auditifs ( $FTL1^{-/-}$  LT pour low-threshold) et des souris à hauts seuils ( $FTL1^{-/-}$  HT pour high-threshold).

Nous avons ensuite mesuré l'activité mécanique des cellules ciliées externes à partir des produits de distorsions des émissions oto-acoustiques (PDEOA). En accord avec les seuils auditifs, les souris  $FTL1^{+/+}$  et  $FTL1^{+/-}$  se caractérisent par des PDEOA d'amplitudes similaires (**figure 5.1I, J**) ( $23,56 \pm 0,93$  dB et  $23,36 \pm 2,06$  dB respectivement). A l'inverse, on note chez

les souris  $FTL1^{-/-}$  une forte hétérogénéité dans l'amplitude des PDEOA, c'est-à-dire que l'on distingue des souris dont l'amplitude des PDEOA est identique à celle des souris  $FTL1^{+/+}$  et  $FTL1^{+/-}$ , et des souris ne présentant pratiquement aucun PDEOA (**figure 5.1K**). Ici encore, les histogrammes de distribution des PDEOA des souris  $FTL1^{+/+}$  et  $FTL1^{+/-}$  peuvent être modélisés avec une distribution normale uni-modale tandis que celui des souris  $FTL1^{-/-}$  suit une distribution gaussienne à deux modes (**figure 5.1L**).

A partir des histogrammes de distribution des seuils auditifs moyens des souris  $FTL1^{-/-}$  (**figure 5.1D**), nous avons pu séparer les individus en deux groupes : les souris dont le seuil auditif moyen était inférieur à 40 dB SPL ( $FTL1^{-/-}$  LT, représentant 76 % des souris  $FTL1^{-/-}$ ) ( $24,58 \pm 0,62$  dB SPL) et les souris dont le seuil auditif moyen était supérieur à 40 dB SPL ( $FTL1^{-/-}$  HT, représentant 24 % des souris knock-out) ( $83,82 \pm 3,54$  dB SPL) (**figure 5.2**). Tandis que les seuils auditifs moyens ( $24,58 \pm 0,62$  dB SPL), les PEA ( $3,60 \pm 0,20$  mV) et les PDEOA ( $21,31 \pm 0,77$  dB) des souris  $FTL1^{-/-}$  LT sont similaires à ceux des souris  $FTL1^{+/+}$  et  $FTL1^{+/-}$  (**figure 5.2 C, F, I**), on note une élévation significative des seuils auditifs et une réduction drastique des PEA chez les souris  $FTL1^{-/-}$  HT par rapport aux souris  $FTL1^{+/+}$  (**figure 5.2C, F**). Cette altération des seuils auditifs et des PEA est associée à une diminution significative des PDEOA ( $1,75 \pm 0,67$  dB) (**figure 5.2 H**), suggérant une atteinte fonctionnelle des cellules ciliées externes chez les souris  $FTL1^{-/-}$  HT (**figure 5.2G, H et I**).

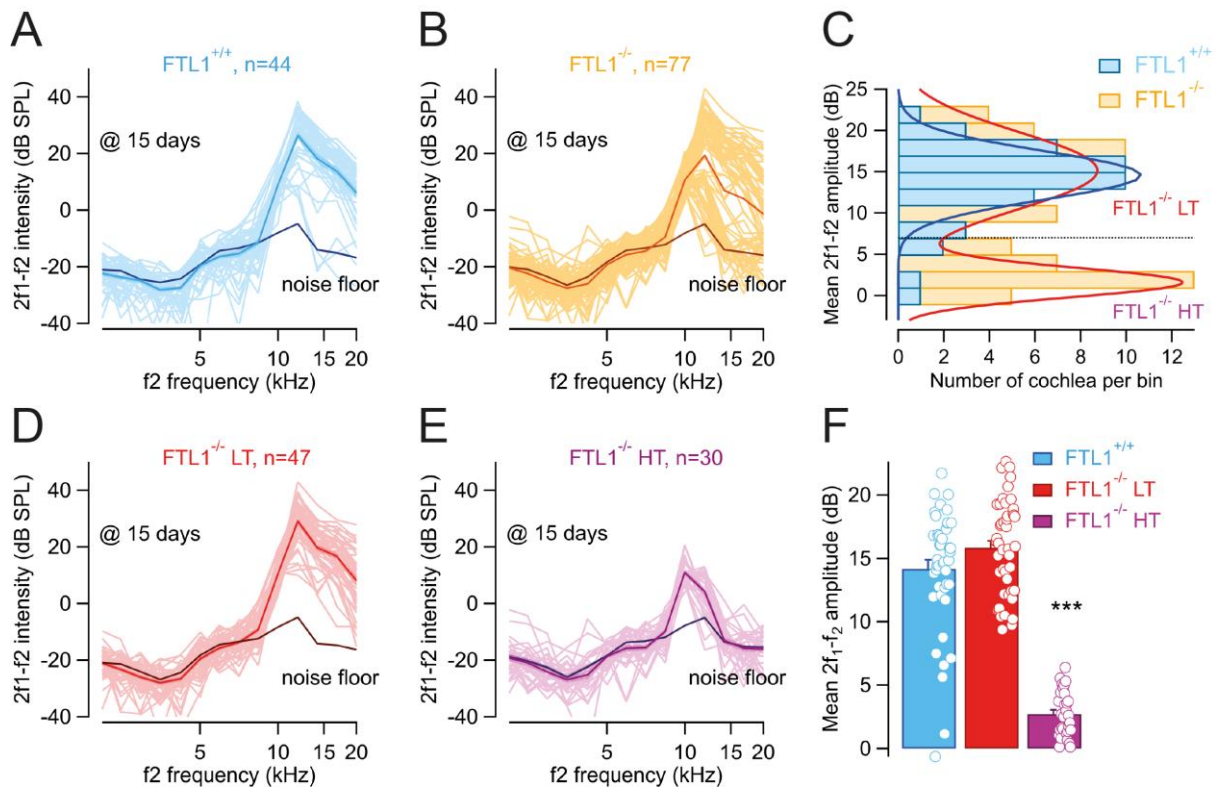


**Figure 5.2 : Atteinte auditive chez les souris  $FTL1^{-/-}$ .** (A-B) Audiogrammes, (D-E) PEA et (G-H) Amplitude du PDEOA 2f<sub>1</sub>-f<sub>2</sub> représentée en fonction de la fréquence f<sub>2</sub> chez les souris knock-out ( $FTL1^{-/-}$  LT, rouge et  $FTL1^{-/-}$  HT, violet). (C, F, I) Moyenne des audiogrammes (C), PEA (F) et PDEOAs (I) chez les souris contrôles ( $FTL1^{+/+}$ , bleu), hétérozygotes ( $FTL1^{+/-}$ , vert) et knock-out ( $FTL1^{-/-}$  LT, rouge et  $FTL1^{-/-}$  HT, violet).

### 5.1.2 Etude longitudinale de la perte auditive chez les souris FTL1<sup>-/-</sup>

Nous avons ensuite voulu savoir si les déficits auditifs chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> étaient présents dès l'entrée en fonction de la cochlée. Nous avons donc mesuré l'activité mécanique des cellules ciliées externes, reflétée par les PDEOA, chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> âgées de 15 jours, qui correspond à l'entrée en fonction de la cochlée chez la souris (**figure 5.3**). De façon similaire aux souris âgées de 1 mois, nous avons observé une hétérogénéité dans l'amplitude des PDEOA des souris FTL1<sup>-/-</sup>, reflétée par une distribution bimodale des PDEOA contre une distribution uni-modale chez les souris FTL1<sup>+/+</sup> (**figure 5.3A, B, C**). Ici encore, nous avons pu séparer les individus en deux groupes à partir de l'histogramme de distribution des PDEOA : les souris FTL1<sup>-/-</sup> LT présentant une amplitude des PDEOA de moyenne supérieure à 7 dB ( $15,85 \pm 0,54$  dB) et les souris FTL1<sup>-/-</sup> HT présentant une amplitude des PDEOA de moyenne inférieure à 7 dB ( $2,72 \pm 0,33$  dB) (**figure 5.3C**). Dès l'entrée en fonction de la cochlée, nous observons donc un premier contingent de souris dont l'amplitude des PDEOA est similaire aux souris FTL1<sup>+/+</sup> ( $14,18 \pm 0,72$  dB) et un second contingent de souris dont l'amplitude des PDEOA est significativement diminuée par rapport aux souris FTL1<sup>+/+</sup> (**figure 5.3D, E et F**). Ces résultats suggèrent donc une altération de l'activité des cellules ciliées externes dans une fraction des souris FTL1<sup>-/-</sup> dès l'entrée en fonction de la cochlée.

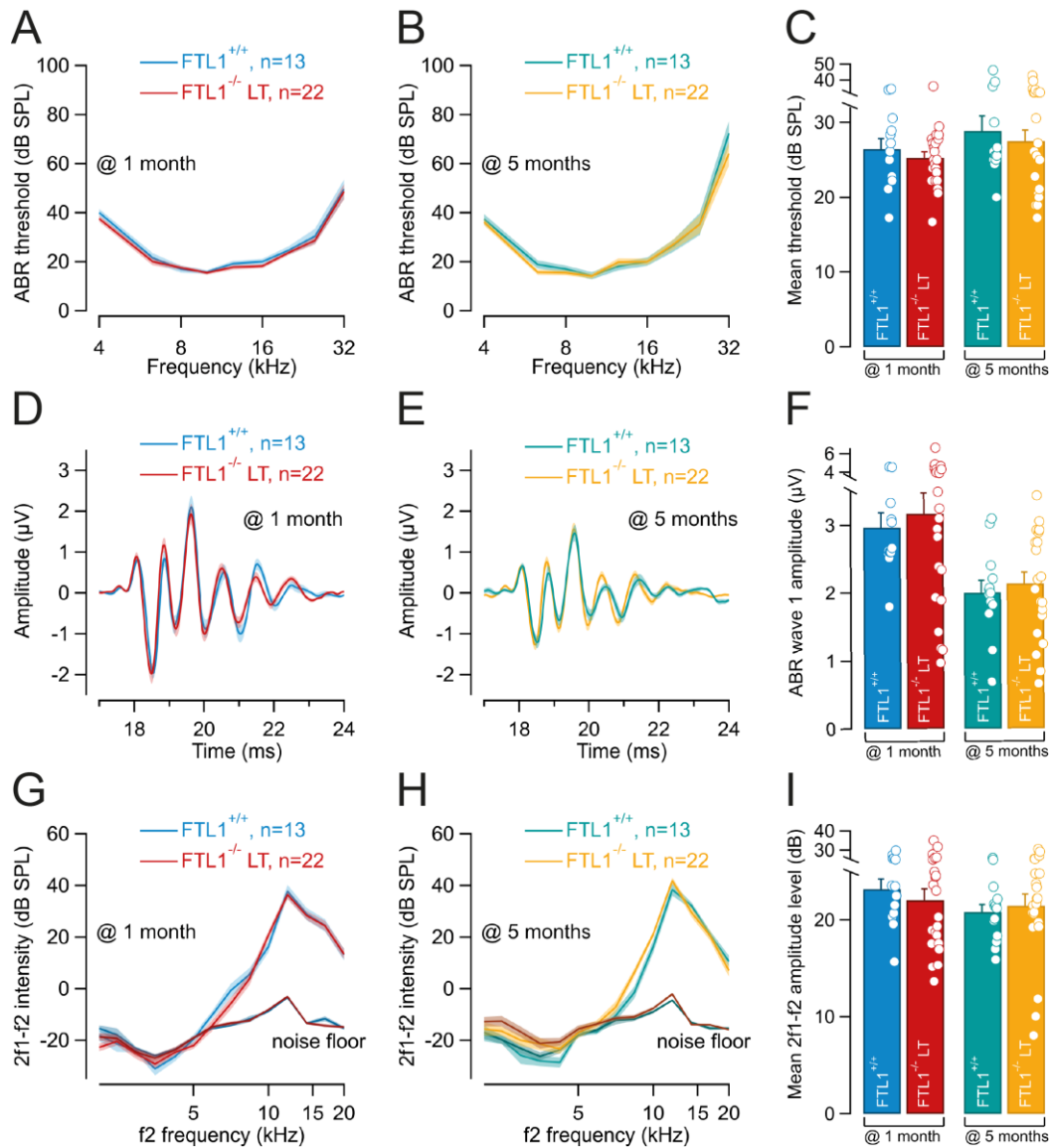




**Figure 5.3 : Diminution des produits de distorsions des émissions otoacoustiques (PDEOAs) chez les souris  $FTL1^{-/-}$  âgées de 15 jours.** (A, B, D, E) Amplitude du PDEOA  $2f_1-f_2$  représentée en fonction de la fréquence  $f_2$  chez les souris contrôles (A,  $FTL1^{+/+}$ , bleu) et knock-out (B,  $FTL1^{-/-}$ , orange) et des souris  $FTL1^{-/-}$  LT (C, rouge) et  $FTL1^{-/-}$  HT (D, violet) à 15 jours post-naissance. (C) Histogrammes de la distribution de l'amplitude des DPEOA  $2f_1-f_2$  présentés en (A-B). (F) Moyenne des PDEOAs des souris contrôles ( $FTL1^{+/+}$ , bleu) et des souris  $FTL1^{-/-}$  LT (rouge) et  $FTL1^{-/-}$  HT (violet).

L'invalidation de la chaîne légère de la ferritine entraîne une atteinte auditive uniquement dans une fraction de souris et dès l'entrée en fonction de la cochlée. En effet, la majorité des souris  $FTL1^{-/-}$  ne présentent pas de défaut fonctionnel auditif. Cette dichotomie pourrait être due à une atteinte progressive chez les animaux  $FTL1^{-/-}$ . Ainsi, les souris  $FTL1^{-/-}$  LT pourraient développer une perte auditive avec le vieillissement. Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré l'activité de la voie auditive ascendante chez les souris  $FTL1^{-/-}$  LT à 1 et 5 mois (**figure 5.4**). Nos résultats ne montrent aucune élévation des seuils auditifs chez les souris  $FTL1^{-/-}$  LT âgées de 5 mois par rapport aux souris  $FTL1^{+/+}$  au même âge ( $27,50 \pm 1,47$  dB SPL

et  $28,85 \pm 2,00$  dB SPL respectivement) (**figure 5.4A- C**). De la même façon, les amplitudes des PEA et des PDEOA sont comparables entre les souris  $FTL1^{+/+}$  et  $FTL1^{-/-}$  LT âgées de 5 mois (**figure 5.4D-I**). Ces données semblent suggérer que les souris  $FTL1^{-/-}$  LT ne développent pas d'atteinte auditive fonctionnelle avec l'âge.



**Figure 5.4 : Les souris  $FTL1^{-/-}$  LT ne développent pas d'atteinte auditive progressive. (A-B)** Audiogrammes, **(D-E)** PEA et **(G-H)** amplitude du PDEOA  $2f_1-f_2$  représentée en fonction de la fréquence  $f_2$  chez les souris  $FTL1^{+/+}$  (bleu et vert), et les souris  $FTL1^{-/-}$  LT (rouge et orange), à l'âge de 1 mois (**A, D, G**) et 5 mois (**B, E, H**). **(C, F, I)** Moyenne des audiogrammes (**C**), PEA (**F**) et PDEOAs (**I**) chez les souris  $FTL1^{+/+}$  et  $FTL1^{-/-}$  LT à l'âge de 1 et 5 mois.

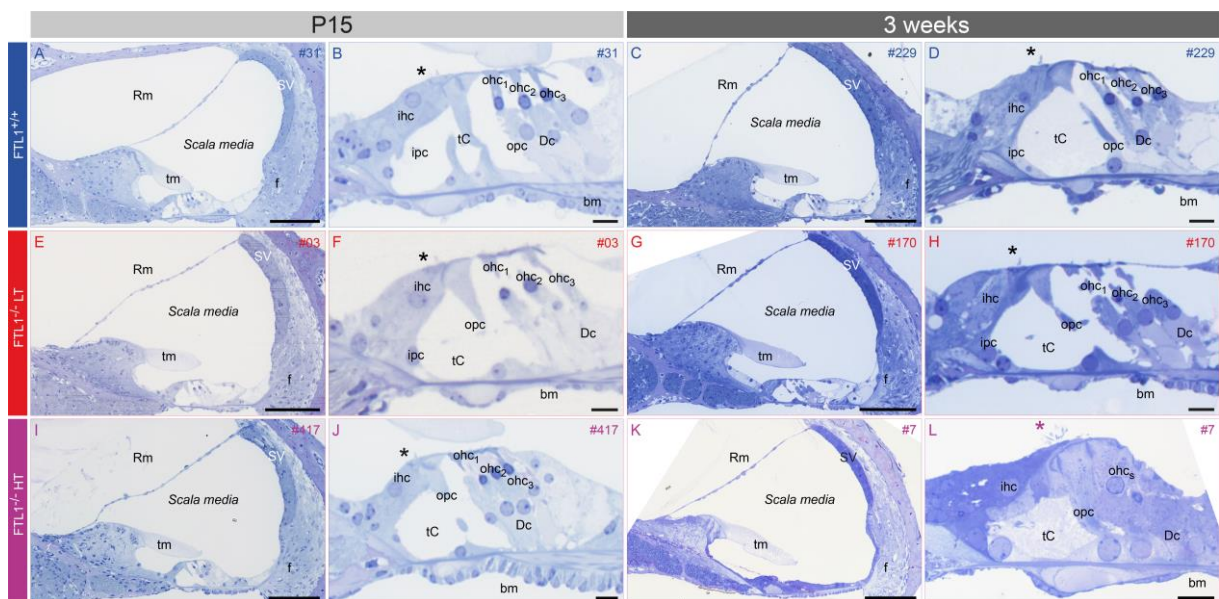
## 5.2 Etude morphologique du phénotype de la souris FTL1<sup>-/-</sup>

Pour déterminer les structures cochléaires altérées chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> HT, nous avons observé la morphologie des cochlées de souris en microscopie photonique, électronique à transmission et à balayage. L'observation anatomique a été réalisée chez des animaux âgés de 15 jours et de 3 semaines. L'amplitude des PDEOA nous permet de distinguer les souris FTL1<sup>-/-</sup> LT des souris FTL1<sup>-/-</sup> HT à P15.

### 5.2.1 Atteinte de l'épithélium sensoriel chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> HT

L'observation des cochlées en microscopie photonique démontre une morphologie de la cochlée préservée chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> LT, que ce soit à 15 jours ou 3 semaines après la naissance, en accord avec les données fonctionnelles (**figure 5.5A-D**). Chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> LT, la membrane de Reissner, la strie vasculaire et les fibrocytes du ligament spiral ne présentent pas de défauts apparents. La membrane tectoriale coiffe les cellules ciliées internes et externes, qui sont séparées par le tunnel de Corti. Ce dernier est bien délimité par les cellules du pilier externe et les cellules du pilier interne. Les cellules ciliées externes sont organisées sur 3 rangées et les stéréocils des cellules ciliées sont bien érigés en faisceau (**figure 5.5E-H**) de façon comparable aux cellules ciliées de souris sauvages (**figure 5.5A-D**). Chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> HT, les structures cochléaires ne présentent pas non plus d'atteintes observables à l'âge de 15 jours. Notamment, les cellules ciliées externes ont un aspect normal. Elles reposent sur les cellules de Deiters et sont séparées entre elles par les espaces de Nuel. Les stéréocils des cellules ciliées internes sont organisés sous forme de faisceaux (**figure 5.5I, J**). En revanche, 3 semaines après la naissance, on observe des dommages sévères chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> HT, à commencer par un effondrement des cellules ciliées externes. Le tunnel de Corti semble

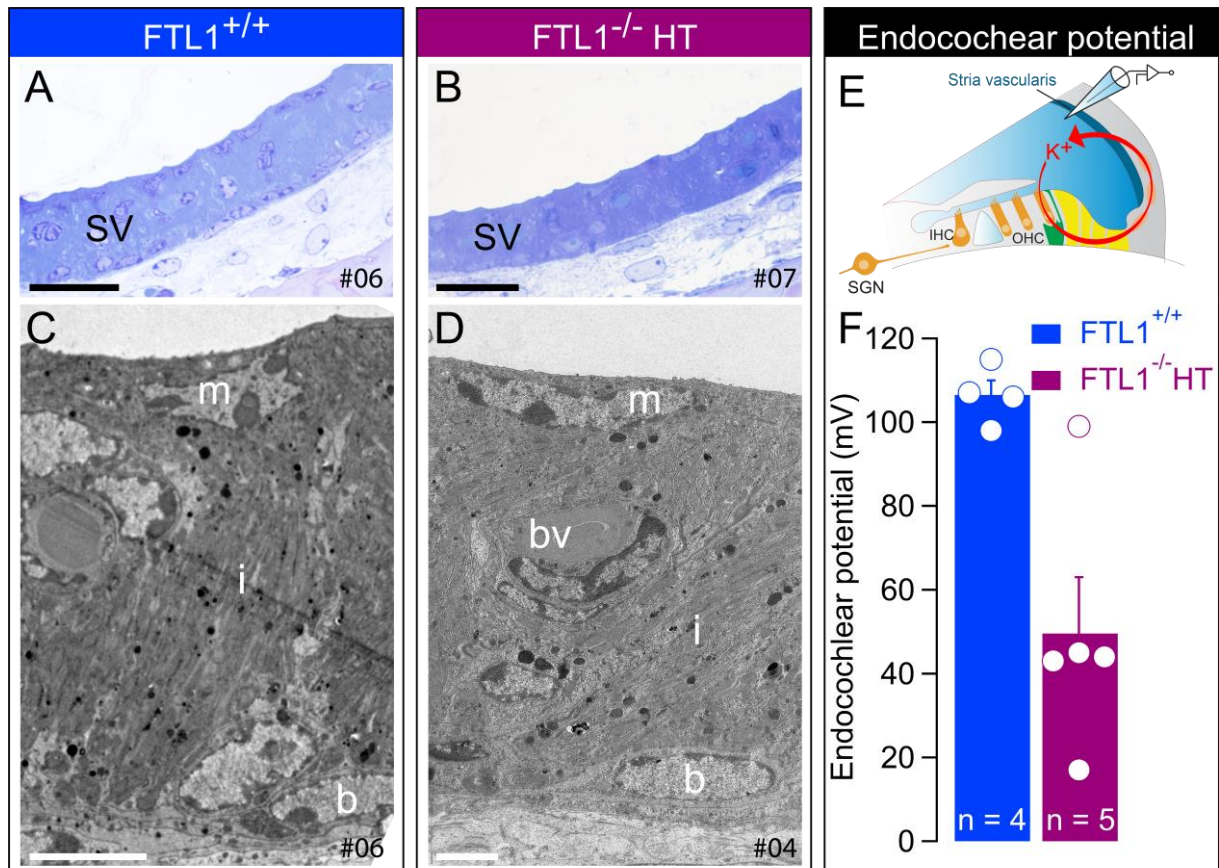
également contenir du matériel et les stéréocils des cellules ciliées internes sont désorganisés. Cependant, les structures de la membrane de Reissner, de la strie vasculaire et des fibrocytes du ligament spiral ne sont pas affectées (chez les souris  $FTL1^{-/-}$  HT âgées de 3 semaines) (**figure 5.5K, L**). L'ensemble de ces résultats suggèrent que i) les atteintes fonctionnelles précèdent les atteintes morphologiques, en raison de la diminution des PDEOA et de la préservation anatomique des cellules ciliées externes à P15, ii) la perte des PDEOA est probablement due à la destruction des cellules ciliées externes, iii) l'atteinte n'est pas limitée aux cellules ciliées externes mais touche aussi les cellules ciliées internes, ce qui peut expliquer en partie les surdités profondes observées chez les souris  $FTL1^{-/-}$  HT et iv) les atteintes morphologiques sont limitées aux cellules sensorielles auditives.



**Figure 5.5 : Coupe transversale du tour médian de cochlées issues de la lignée  $FTL1^{-/-}$ .** (A, C, E, G, I, K) Section du tour médian de la cochlée de la souris  $FTL1^{+/+}$  (A, C),  $FTL1^{-/-}$  LT (E, G) et  $FTL1^{-/-}$  HT (I, K) à P15 (panel de gauche) et à trois semaines (panel de droite). (B, D, F, H, J, L) Agrandissement de l'épithélium sensoriel. Les étoiles indiquent les faisceaux de stéréocils des cellules ciliées internes. (A, C, E, G, I et K) barre d'échelle : 100µm. (B, D, F, H, J et L) barre d'échelle : 5 µm.

## 5.2.2 Morphologie et activité de la strie vasculaire chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> HT

Pour confirmer l'absence de défaut de la strie vasculaire, nous avons examiné son organisation en microscopie électronique à transmission. Chez les animaux FTL1<sup>+/+</sup> et FTL1<sup>-/-</sup> HT, les trois types cellulaires qui constituent la strie vasculaire, à savoir les cellules basales, intermédiaires et marginales, sont parfaitement reconnaissables et ne présentent aucun défaut notable : les noyaux de chaque type cellulaire ont un aspect similaire entre les deux génotypes, aucune vacuole n'est observée et les cellules de la strie ne présentent pas de signes de dégénérescence ou de mort cellulaire. On note une vascularisation normale au sein de la strie vasculaire (**figure 5.6A-D**). Pour confirmer ce résultat, nous avons ensuite mesuré le potentiel endocochléaire, reflet de l'activité électrique de la strie vasculaire, à l'aide d'une micropipette insérée dans la rampe médiane (**figure 5.6E**). Tandis que le potentiel endocochléaire mesuré est de  $106 \pm 3,4$  mV chez les souris FTL1<sup>+/+</sup>, on observe un potentiel endocochléaire de  $49,6 \pm 13,4$  mV chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> HT (**figure 5.6F**). Parmi les souris testées, on note une souris FTL1<sup>-/-</sup> HT avec un potentiel endocochléaire de plus de 90 mV suggérant une variabilité dans l'atteinte fonctionnelle de la strie vasculaire.

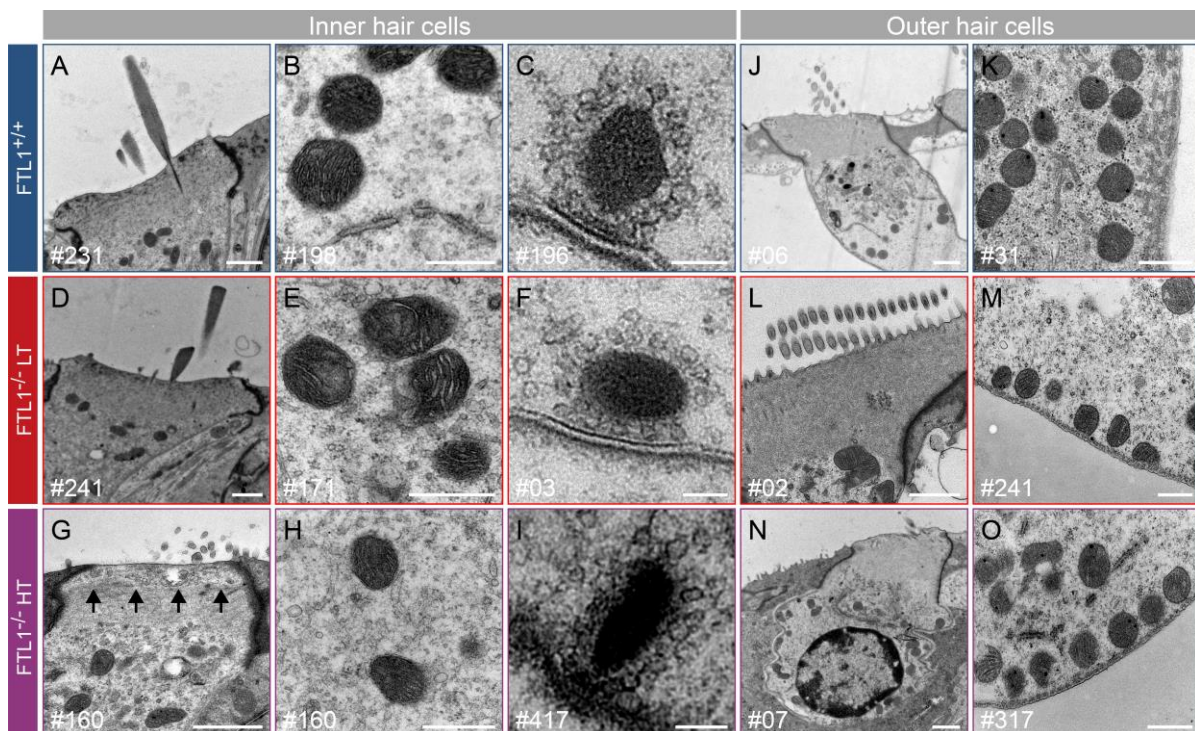


**Figure 5.6 : Morphologie et activité de la stria vasculaire.** (A, B) Section du tour médian de la cochlée, au niveau de la stria vasculaire d'une souris FTL1<sup>+/+</sup> (A, P21) et d'une souris FTL1<sup>-/-</sup> HT (B, P19) en coupe semi-fine. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m. (C, D) Cellules de la stria vasculaire d'une souris FTL1<sup>+/+</sup> (C, P21) et d'une souris FTL1<sup>-/-</sup> HT (D, P21) en microscopie électronique à transmission. Barre d'échelle : 5  $\mu$ m. m : cellule marginale ; i : cellule intermédiaire ; b : cellule basale ; bv : vaisseau sanguin. (E) Schéma indiquant le site d'insertion pour la mesure du potentiel endocochléaire. (F) Potentiel endocochléaire mesuré chez les souris FTL1<sup>+/+</sup> et les souris FTL1<sup>-/-</sup> HT.

### 5.2.3 Altération du pôle apical des cellules ciliées de souris FTL1<sup>-/-</sup> HT

En microscopie électrique à transmission, l'ultrastructure des cellules ciliées des souris FTL1<sup>-/-</sup> HT est similaire à celle des souris FTL1<sup>+/+</sup> : les rangées de stéréocils des cellules ciliées sont ancrées dans la plaque cuticulaire. Cette dernière est relativement dense et les jonctions serrées nettes, suggérant un pôle apical préservé (figure 5.7A, D, J, L). Les mitochondries

présentent elles aussi une structure normale avec des crêtes visibles et l'absence de vacuoles ou de signes de stress mitochondrial (**figure 5. 7B, E, K, M**). On note aussi une distribution normale des mitochondries le long de la membrane plasmique chez les cellules ciliées externes (**figure 5.7K, M**). Enfin, les rubans synaptiques des cellules ciliées internes sont ancrés à la membrane plasmique, opposés à la densité post-synaptique d'une fibre du nerf auditif et entourés d'une monocouche de vésicules synaptiques (**figure 5.7C, F**). Chez les souris  $FTL1^{-/-}$  HT, on observe la présence de granules au sein de la plaque cuticulaire des cellules ciliées internes et l'implantation des stéréocils est difficilement observable (**figure 5.7G**). Les cellules ciliées externes sont déformées avec une importante condensation de l'ADN nucléaire, signe majeur d'un stress cellulaire (**figure 5.7N**). En revanche, les jonctions serrées semblent intactes ainsi que l'ensemble des mitochondries et des rubans synaptiques (**figure 5.7H, I et O**).

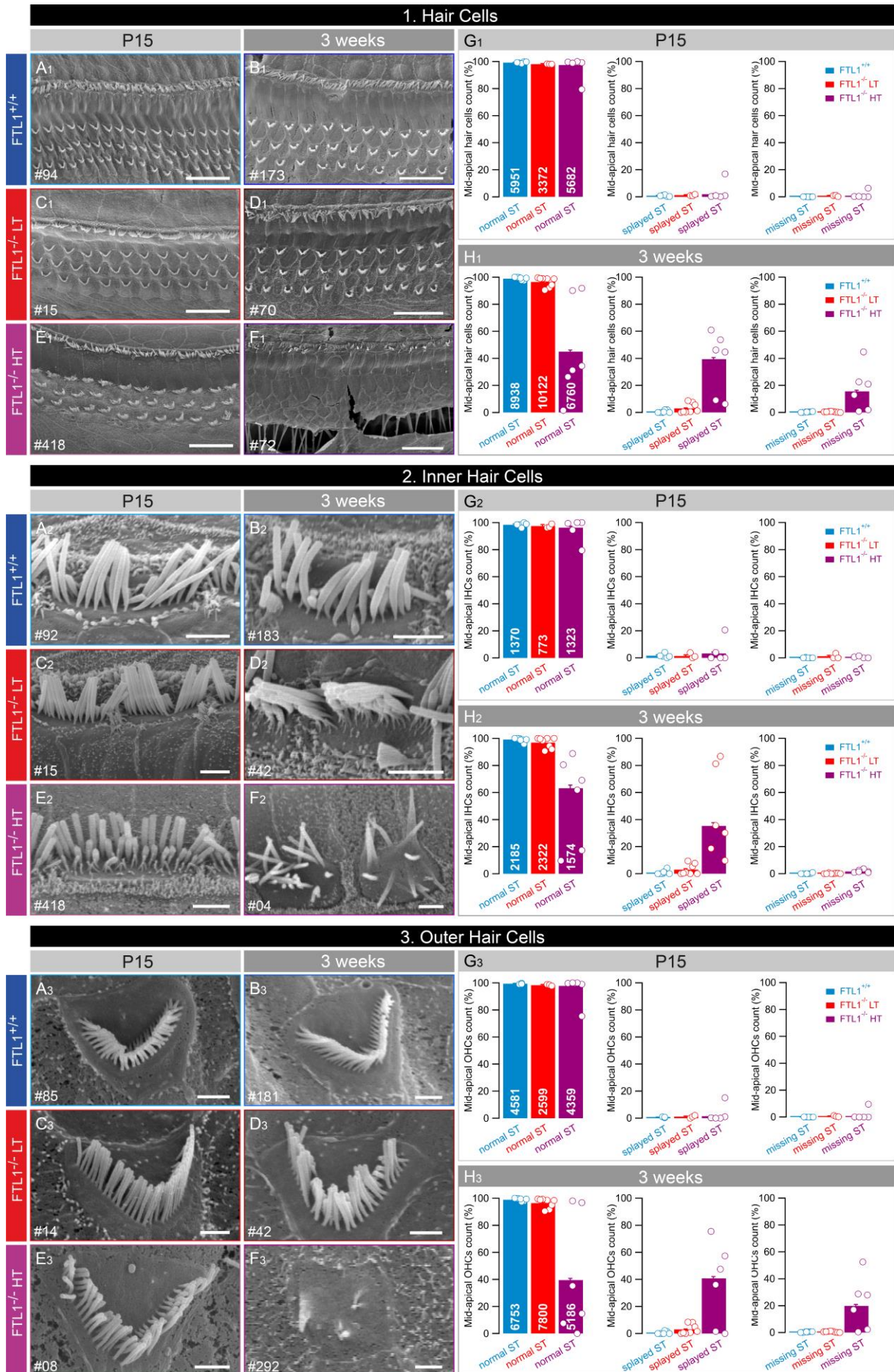


**Figure 5.7 : Observation des cellules sensorielles en microscopie électronique à transmission.** (A, D, G) Exemples de pôle apical de cellules ciliées internes de souris sauvages  $FTL1^{+/+}$  (A) et knock-out  $FTL1^{-/-}$  LT (D) et  $FTL1^{-/-}$  HT (G). (G) Les flèches noires indiquent une granulosité anormale présente dans la plaque cuticulaire des cellules ciliées des souris  $FTL1^{-/-}$  HT. (B, E, H) Exemples de

mitochondries issues de cellules ciliées internes de souris sauvages FTL1<sup>+/+</sup> (**B**) et knock-out FTL1<sup>-/-</sup> LT (**E**) et FTL1<sup>-/-</sup> HT (**H**). (**C, F, I**) Exemples de rubans synaptiques de cellules ciliées internes de souris sauvages FTL1<sup>+/+</sup> (**C**) et knock-out FTL1<sup>-/-</sup> LT (**F**) et FTL1<sup>-/-</sup> HT (**I**). (**J, L, N**) Exemples de pôle apical de cellules ciliées externes de souris sauvages FTL1<sup>+/+</sup> (**J**) et knock-out FTL1<sup>-/-</sup> LT (**L**) et FTL1<sup>-/-</sup> HT (**N**). (**K, M, O**) Exemples de mitochondries et membrane plasmique latérale de cellules ciliées externes de souris sauvages FTL1<sup>+/+</sup> (**K**) et knock-out FTL1<sup>-/-</sup> LT (**M**) et FTL1<sup>-/-</sup> HT (**O**).

Pour quantifier l'atteinte morphologique des cellules ciliées chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> HT, nous avons observé l'épithélium neurosensoriel en microscopie électronique à balayage (**figure 5.8**). Les observations chez les souris sauvages FTL1<sup>+/+</sup> et knock-out FTL1<sup>-/-</sup> LT âgées de 15 jours (**figure 5.8 A<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>**) et de 3 semaines (**figure 5.8 B<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, D<sub>3</sub>**) ne révèlent aucun défaut majeur entre les génotypes, avec des cellules ciliées et des faisceaux de stéréocils normalement distribués et organisés (**figure 5.8 G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>**). De la même façon, les cellules ciliées présentent un aspect normal chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> HT âgées de 15 jours (**figure 5.8 E<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, G<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>, G<sub>3</sub>**). En revanche, on note 40 % de cellules ciliées avec des stéréocils désorganisés ou bien fusionnés chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> HT âgées de 3 semaines, ainsi qu'une perte d'environ 15 % de cellules ciliées (**figure 5.8 F<sub>1</sub>, H<sub>1</sub>**). L'altération des stéréocils est visible dans les deux contingents de cellules ciliées (**figure 5.8 F<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> et H<sub>3</sub>**). Nos observations ne montrent pas de pertes de cellules ciliées internes (inférieure à 2%). En revanche on note une perte d'environ 20 % de cellules ciliées externes chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> HT âgées de 3 semaines (**figure 5.8 H<sub>2</sub> et H<sub>3</sub>**). Toutefois nous avons noté que sur les 6 cochlées observées, issues de 3 souris FTL1<sup>-/-</sup> HT, deux échantillons ne présentent pas de défauts majeurs, suggérant une variabilité intra-individuelle dans les défauts morphologiques (**figure 5.8 H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> et H<sub>3</sub>**).





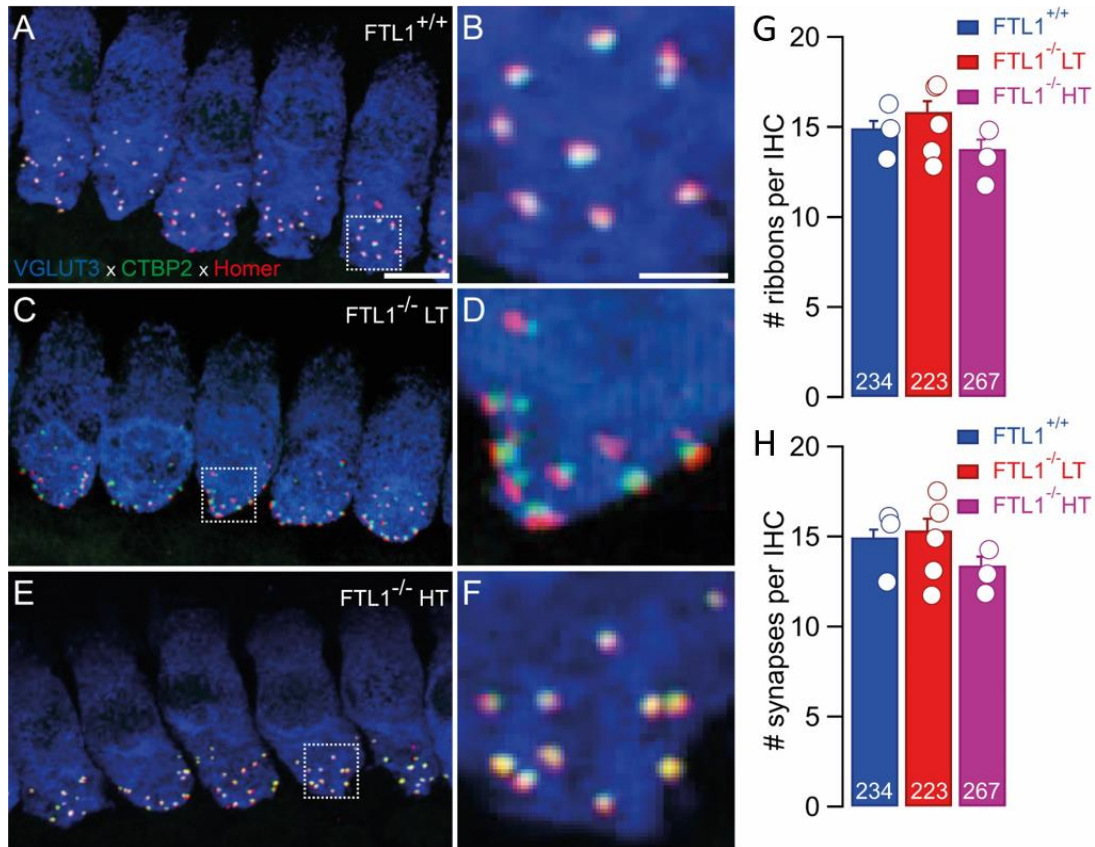
**Figure 5.8 : Défauts morphologiques des cellules sensorielles chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> HT. (A<sub>1</sub>-F<sub>1</sub>)** Exemples d'organe de Corti du tour apical-médian de souris FTL1<sup>+/+</sup> (A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>), FTL1<sup>-/-</sup> LT (C<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>) et FTL1<sup>-/-</sup> HT (E<sub>1</sub>, F<sub>1</sub>) âgées de 15 jours (A<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, E<sub>1</sub>) et 3 semaines (B<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>, F<sub>1</sub>). (A<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, E<sub>1</sub>) échelle : 15µm. (B<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>, F<sub>1</sub>) échelle : 2 µm. (G<sub>1</sub>, H<sub>1</sub>) Moyenne du nombre de cellules présentant des faisceaux de stéréocils normaux, désorganisés, ou des cellules ciliées absentes à 15 jours (G<sub>1</sub>) et à 3 semaines (H<sub>1</sub>). (A<sub>2</sub>-F<sub>2</sub>) Exemples de stéréocils des cellules ciliées internes, issues du tour apical-médian de souris FTL1<sup>+/+</sup> (A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>), FTL1<sup>-/-</sup> LT (C<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>) et FTL1<sup>-/-</sup> HT (E<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>) âgée de 15 jours (A<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>) et 3 semaines (B<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>). (A<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>) échelle : 15µm. (B<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>) échelle : 2 µm. (G<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>) Moyenne du nombre de cellules ciliées internes présentant des faisceaux de stéréocils normaux, désorganisés, ou des cellules ciliées internes absentes à 15 jours (G<sub>2</sub>) ou 3 semaines (H<sub>2</sub>). (A<sub>3</sub>-I<sub>3</sub>) Exemples de stéréocils des cellules ciliées externes, issues du tour apical-médian de souris FTL1<sup>+/+</sup> (A<sub>3</sub>, B<sub>3</sub>), FTL1<sup>-/-</sup> LT (C<sub>3</sub>, D<sub>3</sub>) et FTL1<sup>-/-</sup> HT (E<sub>3</sub>, F<sub>3</sub>) âgée de 15 jours (A<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>, E<sub>3</sub>) et 3 semaines (B<sub>3</sub>, D<sub>3</sub>, F<sub>3</sub>). (A<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>, E<sub>3</sub>) échelle : 15µm. (B<sub>3</sub>, D<sub>3</sub>, F<sub>3</sub>) échelle : 2 µm. (G<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>) Moyenne du nombre de cellules ciliées externes présentant des faisceaux de stéréocils normaux, désorganisés, ou des cellules ciliées externes absentes à 15 jours (G<sub>3</sub>) ou 3 semaines (H<sub>3</sub>).

#### 5.2.4 Nombre et dimension des rubans synaptiques

Au sein du laboratoire, un criblage en double hybride avait identifié une interaction entre la chaîne légère de la ferritine et le domaine B de RIBEYE, qui est le composant majeur du ruban synaptique ([Mahaman Bachir Dodo, Sahia. Identification de nouvelles protéines des synapses à ruban. Montpellier : 2014. Université de Montpellier 1 : thèse de doctorat, Biologie Santé](#)). En absence de la chaîne légère de la ferritine, un défaut morphologique de la synapse en ruban pouvait apparaître. Pour tester cette hypothèse, nous avons compté le nombre des synapses à ruban en microscopie confocale et mesuré la taille des rubans en microscopie super-résolutive STED (**figure 5.9 et 4.10**).

Le triple immuno-marquage des rubans synaptiques avec l'anticorps anti-CtBP2, de la densité post-synaptique à l'aide de l'anticorps dirigé contre Homer, et des cellules ciliées internes avec l'anticorps anti-VGLUT3 a permis de compter le nombre de rubans synaptiques et de synapses (la juxtaposition des éléments pré- et post-synaptiques par cellule ciliée interne définissant la présence d'une synapse auditive) (**figure 5.9A-F**). Dans nos expériences, le

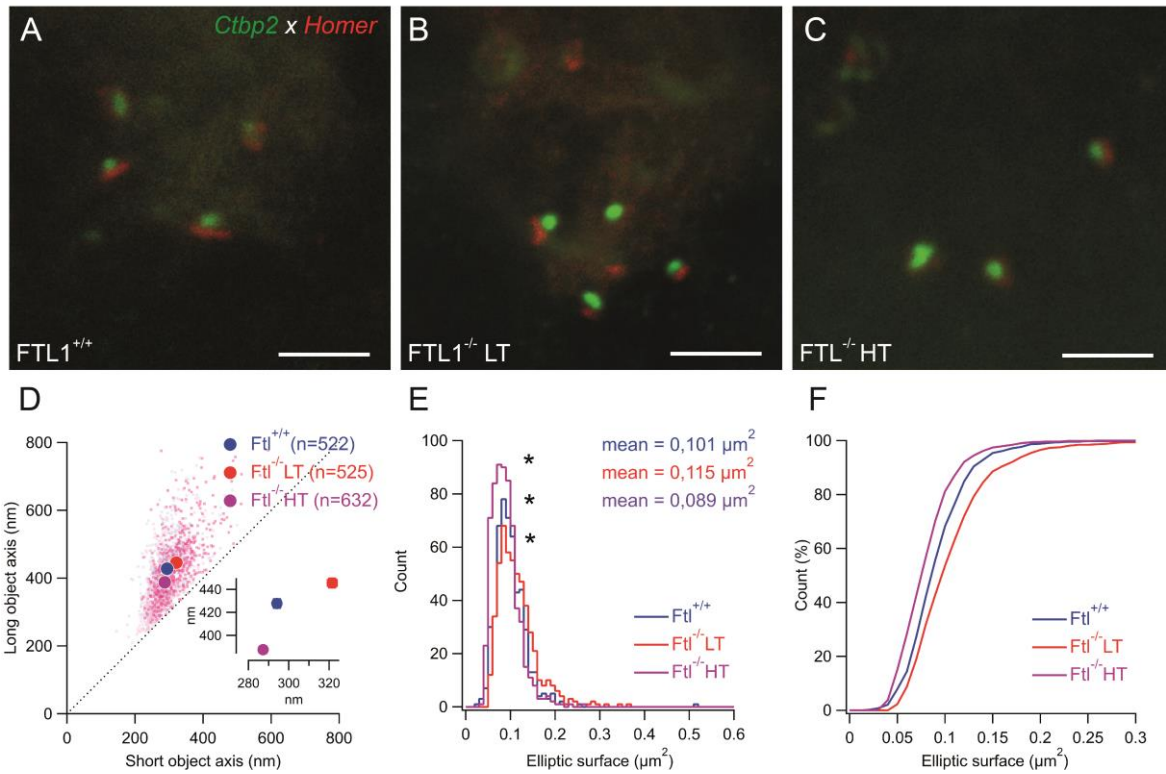
nombre de rubans et de synapses n'est pas significativement différent entre les génotypes (**figure 5.9G et H**). Ces résultats suggèrent donc que l'ablation génétique de FTL1 ne modifie pas ni le nombre de rubans ni le nombre de synapses à rubans des cellules ciliées internes.



**Figure 5.9 : Comptage des rubans et synapses à rubans des cellules ciliées internes.** (A-F) Immunomarquage des CCI (Vglut3, bleu), des rubans synaptiques (Ctbp2, vert) et post-synaptiques (Homer1, rouge) chez des souris âgées de 3 semaines à 1 mois provenant de souris FTL1<sup>+/+</sup> (A-B), FTL1<sup>-/-</sup> LT (C-D) et FTL1<sup>-/-</sup> HT (E-F). Barre d'échelle dans (A, C, E) : 5 μm, et dans (B, D, F) : 1 μm. (G) Moyenne du nombre de rubans par CCI. (H) Moyenne du nombre de synapses par CCI. Les symboles (ronds) représentent la moyenne individuelle pour chaque échantillon.

A l'aide de la microscopie super-résolutive STED, nous avons mesuré la taille des rubans synaptiques (**figure 5.10A-C**). Ces derniers ayant une forme ovoïde, nous avons représenté la longueur de l'axe le plus long en fonction de la longueur de l'axe le plus court correspondant pour chaque ruban (**figure 5.10D**). A partir de ces mesures, nous avons calculé

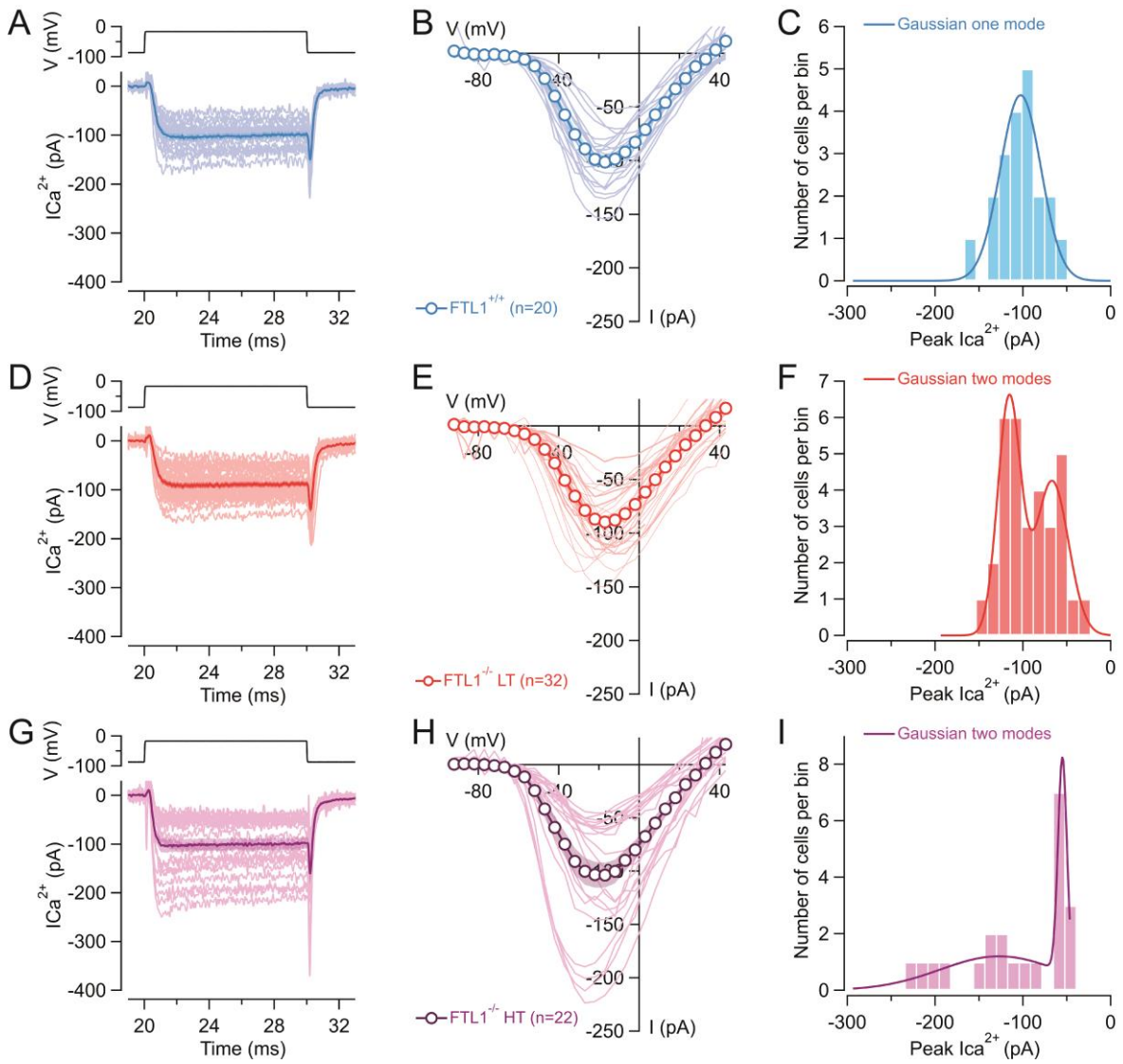
la surface elliptique de chaque ruban et représenté l'histogramme de distribution (**figure 5.10E**) et la distribution cumulative (**figure 5.10F**) de la surface elliptique des rubans synaptiques des CCI. Sur l'axe long et l'axe court, les rubans des souris FTL1<sup>-/-</sup> LT sont plus grands (axe long : 445,624 ± 4,25 nm ; axe court : 321,541 ± 2,41 nm) que ceux des souris FTL1<sup>+/+</sup> (axe long : 427,793 ± 4,18 nm ; axe court : 294,132 ± 1,98 nm) (**figure 5.10D**). En accord avec ce résultat, l'histogramme de distribution et la distribution cumulative montrent un nombre plus élevé de grands rubans synaptiques chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> LT par rapport aux souris FTL1<sup>+/+</sup> (p<0,001) (**figure 5.10E, F**). A l'inverse, les rubans des souris FTL1<sup>-/-</sup> HT sont plus petits que ceux des souris FTL1<sup>+/+</sup> (axe long : 387,594 nm ± 3,31 nm ; axe court : 287,268 nm ± 1,65 nm) (**figure 5.10D**). Ici encore, la distribution de la surface elliptique des rubans montre un nombre plus élevé de petits rubans chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> HT (p<0,001) (**figure 5.10E, F**). Ces résultats pourraient suggérer que l'ablation génétique de FTL1 entraîne une variation des dimensions des rubans synaptiques. Cependant, les variations dans la taille des rubans ne s'accordent pas avec le génotype des souris. En effet, les rubans des souris FTL1<sup>-/-</sup> LT sont plus larges et les rubans des souris FTL1<sup>-/-</sup> HT plus petits que ceux des souris sauvages.



**Figure 5.10 : Rubans synaptiques en microscopie super-résolutive.** (A-C) Images STED des rubans synaptiques (Ctbp2, vert) et de la densité post-synaptique (Homer1, rouge) des CCI de souris FTL1<sup>+/+</sup> (A), FTL1<sup>-/-</sup> LT (B) et FTL1<sup>-/-</sup> HT (C) âgées de 3 semaines à 1 mois. Barre d'échelle : 2 µm. (D) Axes longs représentés en fonction des axes courts correspondants des rubans synaptiques. n indique le nombre de rubans examinés. (E) Histogramme de distribution de la surface elliptique des rubans synaptiques. Les symboles \* indiquent une différence significative ( $p < 0,001$ ), les tests statistiques appliqués étaient un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunne. (F) Distribution cumulative de la surface elliptique des rubans synaptiques.

## 5.3 Modulation de l'amplitude des courants calciques par la ferritine

Nous avons ensuite testé la première étape de l'activité synaptique des CCI des souris de la lignée  $FTL1^{-/-}$ , à savoir la mesure des courants calciques à l'aide de la technique du patch-clamp en configuration cellule-entière (**figure 5.11**). En réponse à un saut de potentiel dépolarisant, l'ouverture des canaux calciques et l'entrée de calcium se traduit par un courant entrant qui s'inactive peu et dont la cinétique d'activation est de l'ordre de 300 microsecondes au pic de la courbe intensité-potentiel (**figure 5.11A, B**). Chez les souris  $FTL1^{+/+}$ , l'amplitude des courants calciques au pic est d'environ -100 pA (**figure 5.11B**). On observe une amplitude similaire chez les souris  $FTL1^{-/-}$  LT et  $FTL1^{-/-}$  HT (**figure 5.11D, E, G et H**). Chez les souris  $FTL1^{+/+}$ , la distribution des courants calciques au pic suit une distribution gaussienne unimodale (**figure 5.11C**). A l'inverse, la distribution des courants calciques au pic chez les souris  $FTL1^{-/-}$  LT et  $FTL1^{-/-}$  HT suit une distribution gaussienne bimodale (**figure 5.11F, I**). Tandis que le maximum du courant calcique se situe à -100 pA chez les souris  $FTL1^{+/+}$ , on note une population de cellules avec des courants calciques dont l'amplitude située aux environs de -110 pA est similaire aux CCI des souris  $FTL1^{+/+}$  mais aussi une population de CCI dont le maximum d'amplitude est proche de -60 pA chez les souris  $FTL1^{-/-}$  LT et  $FTL1^{-/-}$  HT (**figure 5.11C, F et I**). De plus, une fraction de cellules avec des courants anormalement élevés sont observés chez les souris  $FTL1^{-/-}$  HT (**figure 5.11I**). En conclusion, ces résultats semblent montrer que l'absence de la chaîne légère de la ferritine entraîne une variabilité dans l'amplitude du courant calcique à la première synapse auditive.



**Figure 5.11 : Modulation des courants calciques des CCI par FTL1.** (A, D, G) Courants calciques des CCI de souris FTL1+/+ (A, bleu), FTL1<sup>-/-</sup> LT (D, rouge) et FTL1<sup>-/-</sup> HT (G, violet) âgées entre P15 à P19. Les courants sont évoqués en réponse à un saut dépolarisant de -17 mV à partir d'un potentiel de maintien à -87 mV. (B, E, H) Courbe intensité-potentiel des courants calciques des CCI de souris FTL1+/+ (B, bleu), FTL1<sup>-/-</sup> LT (E, rouge) et FTL1<sup>-/-</sup> HT (H, violet) âgées entre P15 à P19. (C, F, I) Histogramme de distribution des courants calciques mesurés présenté en A, D et G respectivement.

## 6 . DISCUSSION



L'ensemble de nos résultats montre que l'ablation génétique de la chaîne légère de la ferritine entraîne un déficit auditif uniquement dans une fraction des souris knock-out (24%). La surdité observée chez ces animaux est associée à la perte d'activité des cellules ciliées externes, requise pour l'amplification cochléaire et la sélectivité en fréquence. L'observation anatomique montre une altération des cellules ciliées externes avec une fusion des stéréocils, et des cellules ciliées externes manquantes. De plus, un contingent de cellules ciliées internes présente une atteinte des stéréocils, similaire à celle observée chez les cellules ciliées externes. Enfin, l'absence de la chaîne légère de la ferritine entraîne une modulation de l'amplitude des courants calciques des cellules ciliées internes.

## 6.1 Atteinte des cellules ciliées chez les souris homozygotes $FTL1^{-/-}$ HT.

La ferritine est une protéine ubiquitaire, hautement conservée (Iancu, 1992; Richter, 1978) dont le rôle principal est de réguler et maintenir le taux de fer libre et cellulaire à son équilibre/maintenir l'homéostasie du fer (Theil, 1987). La ferritine est composée d'un assemblage de 24 sous-unités (480 kDa), formant une enveloppe de forme sphérique creuse, dans laquelle vient se stocker les atomes de fer sous sa forme ferrique (Massover, 1993; Muhoberac and Vidal, 2019). Chez les vertébrés, la ferritine est composée par deux chaînes : la chaîne lourde (FTH) et la chaîne légère (FTL1). Tandis que la chaîne lourde est dotée d'une activité enzymatique ferroxidase lui permettant de catalyser l'oxydation du fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) en fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ), la chaîne légère est impliquée dans la stabilisation de la sphère et le stockage du  $Fe^{3+}$ , correspondant à la forme non soluble du fer. Dans nos expériences, l'élévation des seuils auditifs était associée à la perte des produits de distorsions des émissions oto-acoustiques chez les animaux  $FTL1^{-/-}$  HT. Si la perte fonctionnelle des CCE peut être à l'origine

d'une élévation des seuils jusqu'à 60 dB elle ne peut expliquer à elle seule les surdités complètes observées chez certaines souris  $FTL1^{-/-}$  HT (Lieberman *et al.*, 2002; Ryan and Dallos, 1975). De plus, la perte des mécanismes actifs, c'est-à-dire de l'amplification cochléaire et la sélectivité en fréquence, entraîne une réduction de l'amplitude des PEA uniquement aux faibles intensités de stimulation (Puel *et al.*, 1989, 1990). A l'inverse, l'amplitude des PEA en réponse à de fortes intensités de stimulation n'est pas affectée lors d'une altération des mécanismes actifs (Puel *et al.*, 1989, 1990). La diminution des PEA à 80 dB SPL chez les individus  $FTL1^{-/-}$  HT indique donc que la surdité n'est pas uniquement due à la diminution d'activité des CCE. La désorganisation des stéréocils d'une fraction de CCI pourrait donc contribuer au déficit auditif. Par exemple, l'altération des stéréocils uniquement dans les cellules ciliées internes entraîne une élévation des seuils auditifs et une réduction drastique de l'amplitude des PEA aux fortes intensités de stimulations (Joshi *et al.*, 2021; Surel *et al.*, 2016). Chez les souris  $FTL1^{-/-}$  HT, l'atteinte des cellules ciliées avec la fusion des stéréocils s'oppose à l'intégrité préservée de la strie vasculaire. Ce résultat est surprenant dans la mesure où la strie vasculaire est richement vascularisée et se caractérise par la présence de dépôt de fer et de ferritine (Santos-Sacchi and Marovitz, 1985). Les auteurs de ces observations ont émis l'hypothèse que la ferritine pouvait séquestrer le fer des érythrocytes endommagées des capillaires sanguins et prévenir ainsi un excès de radicaux libres (Santos-Sacchi and Marovitz, 1985). En effet, en raison de son activité ferroxidase et du stockage du fer sous forme ferrique, la ferritine prévient la réaction de Fenton au cours de laquelle les ions de fer ferreux sont oxydés par du peroxyde d'hydrogène entraînant la formation de radicaux libres tels que des radicaux hydroxyles. Toutefois, nos résultats semblent démontrer une altération morphologique de l'épithélium sensoriel de la cochlée, sans affecter les autres structures cochléaires. Une différence dans la composition respective des sous-unités lourde et légère de la ferritine entre les cellules ciliées et les autres structures comme la strie vasculaire pourrait expliquer cette observation (Cairo *et al.*, 1991). Si tel est le cas, la

chaîne légère serait plus abondante dans les cellules ciliées tandis que ce serait la chaîne lourde qui serait prédominante dans la strie vasculaire. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en mesurant l'expression des sous-unités de la ferritine en PCR quantitative dans les différentes structures de la cochlée. Malgré l'ultrastructure intacte de la strie, nous avons observé une réduction du potentiel endocochléaire. Cette diminution ne peut pas s'expliquer par une dégénérescence des cellules de la strie vasculaire (Gratton *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 2014; Ohlemiller, 2009; Schulte and Schmiedt, 1992; Trowe *et al.*, 2011). Dès lors, l'absence de la ferritine pourrait entraîner une diminution de l'activité des canaux ioniques des cellules de la strie, comme le canal potassique Kir4.1 ou bien le canal chlore CIC (Hibino *et al.*, 1997; Nin *et al.*, 2008; Rickheit *et al.*, 2008). Une autre hypothèse serait un défaut de recyclage du potassium vers les cellules de la strie (Cazals *et al.*, 2015; Minowa *et al.*, 1999), pouvant être en partie causé par la fusion de stéréocils et l'effondrement des cellules ciliées externes. A l'inverse, on ne peut pas exclure un défaut de recyclage du potassium à proximité des cellules ciliées externes entraînant une accumulation de potassium et conduisant à la dégénérescence des cellules sensorielles auditives. Quel que soit le mécanisme, nos résultats indiquent que l'altération des deux types de cellules ciliées et la diminution du potentiel endocochléaire sont responsables du déficit auditif chez les animaux homozygotes  $FTL1^{-/-}$  HT.

## 6.2 La dégénérescence des cellules ciliées reflète-t-elle une ferroptose cochléaire ?

Récemment, une nouvelle forme de mort cellulaire, la ferroptose, a été décrite (Dixon and Stockwell, 2014; Dixon *et al.*, 2012). La ferroptose semble distincte de l'apoptose (absence de condensation de la chromatine), de la nécrose (absence de gonflement d'organites et préservation de la membrane plasmique) et de l'autophagie (absence de vésicules à double

membrane) (Dixon *et al.*, 2012). En revanche, la ferroptose se distingue par un arrondissement de la cellule et par la présence de mitochondries plus petites, denses aux électrons, mais présentant une activité normale. Ce type de mort cellulaire repose sur l'inhibition de l'antiporteur Cystine/glutamate, entraînant une diminution de l'activité anti-oxydante du glutathion, ce qui en présence de fer ferreux, favorise la production de radicaux libres et une peroxydation lipidique. Dans les cellules cardiaques, l'absence de la chaîne lourde entraîne une perte cellulaire dont les caractéristiques sont similaires à la ferroptose (Fang Xuexian *et al.*, 2020). Chez les cellules ciliées des souris FTL1<sup>-/-</sup> HT, la morphologie intacte des mitochondries, de la membrane plasmique et l'absence de vacuoles à double membrane pourraient exclure des mécanismes d'apoptose, de nécrose ou d'autophagie dans l'étape précoce de la perte auditive. Cependant, de futures expériences qui consistent à mesurer les radicaux libres et la peroxydation lipidique sont nécessaires pour déterminer si la mort cellulaire est de type ferroptotique. Si tel est le cas, l'application d'antioxydants pourraient prévenir la mort cellulaire chez les souris FTL1<sup>-/-</sup> (Benkafadar *et al.*, 2019; Wang and Puel, 2018; Wang *et al.*, 2007)).

Quel que soit le mécanisme à l'origine de la perte cellulaire, nos résultats soulignent l'importance de la ferritine dans la survie des cellules ciliées. Cependant, la plupart des mutants de la chaîne légère de la ferritine sont à l'origine de neuroferritinopathie qui se caractérisent par des mouvements involontaires avec des troubles extrapyramidaux et une altération des capacités cognitives (Cozzi *et al.*, 2013; Curtis *et al.*, 2001; Devos *et al.*, 2009; Kubota *et al.*, 2009; Mancuso *et al.*, 2005; Ni *et al.*, 2016; Nishida *et al.*, 2014; Ohta *et al.*, 2008; Ory-Magne *et al.*, 2009; Storti *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2019) ou bien un syndrome des jambes sans repos (Cozzi *et al.*, 2013), mais n'ont pas été associées à une perte auditive chez l'homme.

## 6.3 Variabilité du phénotype chez les souris homozygotes $FTL1^{-/-}$

La perte de la chaîne légère de la ferritine entraîne deux phénotypes remarquables chez les souris  $FTL1^{-/-}$ , avec un phénotype similaire aux souris  $FTL1^{+/+}$  et un autre dans lequel les souris développent une surdité. L'origine de ces deux phénotypes pourrait être intrinsèque, par exemple, due au sexe des animaux. Si tel était le cas, nous devrions observer une atteinte chez environ 50 % des animaux. Or, le ratio observé, à savoir 76 % des souris avec une audition normale contre 24 % de souris avec une élévation des seuils auditifs, ne soutient pas cette hypothèse. De plus, des atteintes auditives ont été observées aussi bien chez les femelles que chez les mâles. Un autre facteur intrinsèque pourrait être l'âge des animaux. Dans cette hypothèse, les animaux développeraient une surdité avec le vieillissement. Cependant les animaux  $FTL1^{-/-}$  LT âgés de 5 mois ne développaient pas de perte auditive. Enfin, une compensation par la chaîne lourde de la ferritine pourrait expliquer l'absence de phénotype chez les souris  $FTL1^{-/-}$  LT (Ferreira *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2015). Cette hypothèse repose sur un raisonnement circulaire dans la mesure où elle présuppose une compensation partielle. Une origine environnementale peut-elle alors expliquer les deux phénotypes chez les souris homozygotes knock-out ? Chez les souris dont le gène qui code pour la FTH a été invalidé, un régime alimentaire riche en fer exacerbe l'atteinte cardiaque (Fang Xuexian *et al.*, 2020). Ici, des expériences complémentaires consistant à nourrir les souris avec un régime supplémenté en fer permettront de savoir si une variabilité dans l'accumulation en fer est responsable des deux phénotypes. Enfin, une hypothèse pouvant expliquer l'apparition des deux phénotypes serait une susceptibilité au bruit environnant (Kujawa and Liberman, 2009). En effet, certaines souris plus exposées au bruit pourraient développer une atteinte auditive (Defourny *et al.*, 2019; Delmaghani *et al.*, 2015; Hakuba *et al.*, 2000). Il a été noté que l'exposition des souris

hétérozygotes pour la chaîne lourde de la ferritine (FTH<sup>+/-</sup>) à des stress lumineux provoque une dégénération de la rétine (Picard *et al.*, 2011). Si tel est cas, les souris FTL1<sup>-/-</sup> LT devrait être plus vulnérables au traumatisme sonore par rapport aux souris sauvages.

## 6.4 FTL1, une protéine à proximité des rubans ?

La principale motivation de ce travail de thèse reposait sur le résultat d'un crible en double-hybride identifiant la chaîne légère de la ferritine interagissant avec le domaine B terminal de RIBEYE, le principal composant des rubans synaptiques. Toute atteinte spécifique des synapses des CCI provoque une neuropathie auditive, qui se caractérise par des otoémissions acoustiques préservées et une diminution ou une désynchronisation des potentiels auditifs évoqués (Moser and Starr, 2016). Nos résultats montrant une altération dans les deux types des cellules ciliées avec une fusion du faisceau de stéréocils ne permettent pas de soutenir un rôle spécifique de la ferritine à la synapse des CCI. De plus, le nombre des synapses à rubans n'est pas modifié par l'absence de FTL1 et la diminution de la taille des rubans, de l'ordre de 40 nm, pourrait refléter un mécanisme de dommage générale de la cellule chez la souris FTL1<sup>-/-</sup> HT. Le domaine B de RIBEYE étant similaire au facteur de transcription CtBP2 (Schmitz *et al.*, 2000), les résultats du double-hybride pourraient refléter les interactions au sein de la machinerie transcriptionnelle. En accord avec cette hypothèse, une translocation de la ferritine dans le noyau d'hépatocytes lors de surcharge en fer, ou bien de cellules de l'épithélium de cornée et neuronales en conditions physiologiques a bien été observée (Alkhateeb and Connor, 2010; Cai *et al.*, 1997; Cheepsunthorn *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1990). Cependant, seule la chaîne lourde a été détectée dans le noyau et non la chaîne légère (Thompson *et al.*, 2002). Des expériences complémentaires, à savoir de co-immunoprécipitation ou bien d'histo-immunocytochimie, sont donc nécessaires pour valider ou infirmer les données obtenues en double-hybride.

Chez les souris  $FTL1^{+/+}$ , la distribution de l'amplitude des courants calciques est homogène. A l'inverse, les cellules ciliées internes des souris  $FTL1^{-/-}$  se caractérisent par des courants de faible amplitude et des courants similaires à ceux des cellules ciliées de souris  $FTL1^{+/+}$ . La diminution des courants calciques pourrait être due à une augmentation de radicaux libres dans les souris homozygotes  $FTL1^{-/-}$ . Cette hypothèse est en accord avec la réduction des courants calciques de type L par l'oxydation sur les résidus cystéines (Chiamvimonvat *et al.*, 1995). Si la modulation des courants calciques est due à des radicaux libres, l'application d'antioxydants chez les souris  $FTL1^{-/-}$  pourrait prévenir la réduction des courants calciques.

De plus, nous avons mesuré des courants plus amples dans quelques cellules de souris  $FTL1^{-/-}$  HT. Ici encore, cet effet pourrait être dû à une action des radicaux libres, en accord avec un effet potentialisateur du peroxyde d'hydrogène sur les courants calciques natifs ou exprimées dans des systèmes hétérologues (Akaishi *et al.*, 2004; Li *et al.*, 1998). Ainsi, le stress oxydatif provoqué par l'absence de ferritine pourrait avoir deux effets opposés, à savoir une diminution et/ou une augmentation de l'amplitude des courants calciques. Ces variations du courant calcique pourraient refléter deux états consécutifs des canaux ou bien dépendre de la concentration ou de la durée d'exposition aux radicaux libres. La mesure des courants calciques des cellules ciliées internes en présence d'agents oxydants, à différentes concentrations, permettra de valider cette hypothèse.

L'ensemble de ces résultats ne soutient pas le modèle dans lequel la fonction de la ferritine aurait été recyclée pour participer à l'ultrastructure des synapses à ruban. En revanche, ces travaux suggèrent que la ferritine pourrait prévenir un excès de radicaux libres dans la cochlée, et probablement dans les cellules ciliées. L'interaction de la ferritine avec RIBEYE pourrait refléter une protection locale, voire privilégiée des canaux calciques de la synapse à rubans contre la formation de radicaux libres et la peroxydation lipidique.

## 7 . REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Abboud, S., and Haile, D.J. (2000). A Novel Mammalian Iron-regulated Protein Involved in Intracellular Iron Metabolism \*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 19906–19912. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000713200>.
- Akaishi, T., Nakazawa, K., Sato, K., Saito, H., Ohno, Y., and Ito, Y. (2004). Hydrogen peroxide modulates whole cell Ca<sup>2+</sup> currents through L-type channels in cultured rat dentate granule cells. *Neurosci Lett* 356, 25–28. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.11.012>.
- Akil, O., Seal, R.P., Burke, K., Wang, C., Alemi, A., Daring, M., Edwards, R.H., and Lustig, L.R. (2012). Restoration of Hearing in the VGLUT3 Knockout Mouse Using Virally Mediated Gene Therapy. *Neuron* 75, 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.019>.
- Alkhateeb, A.A., and Connor, J.R. (2010). Nuclear ferritin: A new role for ferritin in cell biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1800, 793–797. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.03.017>.
- Araya-Secchi, R., Neel, B.L., and Sotomayor, M. (2016). An elastic element in the protocadherin-15 tip link of the inner ear. *Nat Commun* 7, 13458. <https://doi.org/10.1038/ncomms13458>.
- Arosio, P., and Levi, S. (2010). Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1800, 783–792. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.02.005>.
- Ashmore, J. (2008). Cochlear Outer Hair Cell Motility. *Physiological Reviews* 88, 173–210. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2006>.
- Aziz, N., and Munro, H.N. (1986). Both subunits of rat liver ferritin are regulated at a translational level by iron induction. *Nucleic Acids Research* 14, 915–927. <https://doi.org/10.1093/nar/14.2.915>.
- Baig, S.M., Koschak, A., Lieb, A., Gebhart, M., Dafinger, C., Nürnberg, G., Ali, A., Ahmad, I., Sinnegger-Brauns, M.J., Brandt, N., et al. (2011). Loss of Cav1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat Neurosci* 14, 77–84. <https://doi.org/10.1038/nn.2694>.
- Barclay, M., Ryan, A.F., and Housley, G.D. (2011). Type I vs type II spiral ganglion neurons exhibit differential survival and neuritogenesis during cochlear development. *Neural Development* 6, 33. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-6-33>.
- Bartlett, E.L. (2013). The organization and physiology of the auditory thalamus and its role in processing acoustic features important for speech perception. *Brain and Language* 126, 29–48. <https://doi.org/10.1016/j.bandl.2013.03.003>.
- Bartsch, T.F., Hengel, F.E., Oswald, A., Dionne, G., Chipendo, I.V., Mangat, S.S., El Shatanofy, M., Shapiro, L., Müller, U., and Hudspeth, A.J. (2019). Elasticity of individual protocadherin 15 molecules implicates tip links as the gating springs for hearing. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 11048–11056. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902163116>.
- Bavi, N., Clark, M.D., Contreras, G.F., Shen, R., Reddy, B.G., Milewski, W., and Perozo, E. (2021). The conformational cycle of prestin underlies outer-hair cell electromotility. *Nature* 600, 553–558. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04152-4>.
- Beaumont, C., Leneuve, P., Devaux, I., Scoazec, J.-Y., Berthier, M., Loiseau, M.-N., Grandchamp, B., and Bonneau, D. (1995). Mutation in the iron responsive element of the L ferritin mRNA in a family with dominant hyperferritinaemia and cataract. *Nat Genet* 11, 444–446. <https://doi.org/10.1038/ng1295-444>.

- Becker, L., Schnee, M.E., Niwa, M., Sun, W., Maxeiner, S., Talaei, S., Kachar, B., Rutherford, M.A., and Ricci, A.J. (2018). The presynaptic ribbon maintains vesicle populations at the hair cell afferent fiber synapse. *ELife* 7, e30241. <https://doi.org/10.7554/eLife.30241>.
- Benkafadar, N., François, F., Affortit, C., Casas, F., Ceccato, J.-C., Menardo, J., Venail, F., Malfroy-Camine, B., Puel, J.-L., and Wang, J. (2019). ROS-Induced Activation of DNA Damage Responses Drives Senescence-Like State in Postmitotic Cochlear Cells: Implication for Hearing Preservation. *Mol Neurobiol* 56, 5950–5969. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1493-6>.
- Beurg, M., Fettiplace, R., Nam, J.-H., and Ricci, A.J. (2009). Localization of inner hair cell mechanotransducer channels using high-speed calcium imaging. *Nat Neurosci* 12, 553–558. <https://doi.org/10.1038/nn.2295>.
- Beurg, M., Michalski, N., Safieddine, S., Bouleau, Y., Schneggenburger, R., Chapman, E.R., Petit, C., and Dulon, D. (2010). Control of Exocytosis by Synaptotagmins and Otoferlin in Auditory Hair Cells. *J. Neurosci.* 30, 13281–13290. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2528-10.2010>.
- Braga, J., Samir, C., Risser, L., Dumoncel, J., Descouens, D., Thackeray, J., Balaesque, P., Oettlé, A., Loubes, J.-M., and Fradi, A. (2019). Cochlear shape reveals that the human organ of hearing is sex-typed from birth. *Scientific Reports* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47433-9>.
- Bunt, A.H. (1971). Enzymatic digestion of synaptic ribbons in amphibian retinal photoreceptors. *Brain Research* 25, 571–577. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90461-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90461-6).
- Butan, C., Song, Q., Bai, J.-P., Tan, W.J.T., Navaratnam, D., and Santos-Sacchi, J. (2022). Single particle cryo-EM structure of the outer hair cell motor protein prestin. *Nat Commun* 13, 290. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27915-z>.
- Cai, C.X., Birk, D.E., and Linsenmayer, T.F. (1997). Ferritin is a developmentally regulated nuclear protein of avian corneal epithelial cells. *J Biol Chem* 272, 12831–12839. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12831>.
- Cairo, G., Rappocciolo, E., Tacchini, L., and Schiaffonati, L. (1991). Expression of the genes for the ferritin H and L subunits in rat liver and heart. Evidence for tissue-specific regulations at pre- and post-translational levels. *Biochem J* 275, 813–816. .
- Cazals, Y., Bévangut, M., Zanella, S., Brocard, F., Barhanin, J., and Gestreau, C. (2015). KCNK5 channels mostly expressed in cochlear outer sulcus cells are indispensable for hearing. *Nat Commun* 6, 8780. <https://doi.org/10.1038/ncomms9780>.
- Chakrabarti, R., Michanski, S., and Wichmann, C. (2018). Vesicle sub-pool organization at inner hair cell ribbon synapses. *EMBO Reports* 19, e44937. <https://doi.org/10.15252/embr.201744937>.
- Chapochnikov, N.M., Takago, H., Huang, C.-H., Pangršič, T., Khimich, D., Neef, J., Auge, E., Göttfert, F., Hell, S.W., Wichmann, C., et al. (2014). Uniquantal Release through a Dynamic Fusion Pore Is a Candidate Mechanism of Hair Cell Exocytosis. *Neuron* 83, 1389–1403. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.003>.
- Cheepsunthorn, P., Palmer, C., and Connor, J.R. (1998). Cellular distribution of ferritin subunits in postnatal rat brain. *J Comp Neurol* 400, 73–86. .
- Chiamvimonvat, N., O'Rourke, B., Kamp, T.J., Kallen, R.G., Hofmann, F., Flockerzi, V., and Marban, E. (1995). Functional Consequences of Sulfhydryl Modification in the Pore-Forming Subunits of

Cardiovascular Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> Channels. *Circulation Research* 76, 325–334.  
<https://doi.org/10.1161/01.RES.76.3.325>.

Chinnery, P.F., Curtis, A.R.J., Fey, C., Coulthard, A., Crompton, D.E., Curtis, A., Lombès, A., and Burn, J. (2003). Neuroferritinopathy in a French family with late onset dominant dystonia.

Chinnery, P.F., Crompton, D.E., Birchall, D., Jackson, M.J., Coulthard, A., Lombès, A., Quinn, N., Wills, A., Fletcher, N., Mottershead, J.P., et al. (2007). Clinical features and natural history of neuroferritinopathy caused by the FTL1 460InsA mutation. *Brain* 130, 110–119.  
<https://doi.org/10.1093/brain/awl319>.

Cho, S., and von Gersdorff, H. (2012). Ca<sup>2+</sup> influx and neurotransmitter release at ribbon synapses. *Cell Calcium* 52, 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.06.004>.

Corey, D.P., and Hudspeth, A.J. (1983). Kinetics of the receptor current in bullfrog saccular hair cells. *J Neurosci* 3, 962–976. .

Cozzi, A., Santambrogio, P., Privitera, D., Broccoli, V., Rotundo, L.I., Garavaglia, B., Benz, R., Altamura, S., Goede, J.S., Muckenthaler, M.U., et al. (2013). Human L-ferritin deficiency is characterized by idiopathic generalized seizures and atypical restless leg syndrome. *Journal of Experimental Medicine* 210, 1779–1791. <https://doi.org/10.1084/jem.20130315>.

Crichton, R.R. (1971). Ferritin: Structure, Synthesis and Function. *N Engl J Med* 284, 1413–1422.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM197106242842506>.

Crichton, R.R. (1990). Proteins of Iron Storage and Transport. In *Advances in Protein Chemistry*, C.B. Anfinsen, J.T. Edsall, F.M. Richards, and D.S. Eisenberg, eds. (Academic Press), pp. 281–363.

Curtis, A.R., Fey, C., Morris, C.M., Bindoff, L.A., Ince, P.G., Chinnery, P.F., Coulthard, A., Jackson, M.J., Jackson, A.P., McHale, D.P., et al. (2001). Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nat Genet* 28, 350–354.  
<https://doi.org/10.1038/ng571>.

Dallos, P. (2008). Cochlear amplification, outer hair cells and prestin. *Current Opinion in Neurobiology* 18, 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.08.016>.

De Domenico, I., Ward, D.M., Langelier, C., Vaughn, M.B., Nemeth, E., Sundquist, W.I., Ganz, T., Musci, G., and Kaplan, J. (2007). The Molecular Mechanism of Heparin-mediated Ferroportin Down-Regulation. *MBoC* 18, 2569–2578. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-01-0060>.

Defourny, J., Aghaie, A., Perfettini, I., Avan, P., Delmaghani, S., and Petit, C. (2019). Pejvakin-mediated pexophagy protects auditory hair cells against noise-induced damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, 8010–8017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821844116>.

Delmaghani, S., Defourny, J., Aghaie, A., Beurg, M., Dulon, D., Thelen, N., Perfettini, I., Zelles, T., Aller, M., Meyer, A., et al. (2015). Hypervulnerability to Sound Exposure through Impaired Adaptive Proliferation of Peroxisomes. *Cell* 163, 894–906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.023>.

Devos, D., Tchofo, P.J., Vuillaume, I., Destée, A., Batey, S., Burn, J., and Chinnery, P.F. (2009). Clinical features and natural history of neuroferritinopathy caused by the 458dupA FTL mutation. *Brain* 132, e109. <https://doi.org/10.1093/brain/awn274>.

- tom Dieck, S., Altrock, W.D., Kessels, M.M., Qualmann, B., Regus, H., Brauner, D., Fejtová, A., Bracko, O., Gundelfinger, E.D., and Brandstätter, J.H. (2005). Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse. *J Cell Biol* 168, 825–836. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408157>.
- Dixon, S.J., and Stockwell, B.R. (2014). The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol* 10, 9–17. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1416>.
- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Scouta, R., and Zaitsev, E.M. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death.
- Dolma, S., Lessnick, S.L., Hahn, W.C., and Stockwell, B.R. (2003). Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell* 3, 285–296. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00050-3](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00050-3).
- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S.J., Moynihan, J., Paw, B.H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., et al. (2000). Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403, 776–781. <https://doi.org/10.1038/35001596>.
- Drysdale, J.W. (1988). Human Ferritin Gene Expression. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, W.E. Cohn, and K. Moldave, eds. (Academic Press), pp. 127–155.
- Edmonds, B.W., Gregory, F.D., and Schweizer, F.E. (2004). Evidence that fast exocytosis can be predominantly mediated by vesicles not docked at active zones in frog saccular hair cells. *The Journal of Physiology* 560, 439–450. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.066035>.
- Ehret, G., and Frankenreiter, M. (1977). Quantitative analysis of cochlear structures in the house mouse in relation to mechanisms of acoustical information processing. *J. Comp. Physiol.* 122, 65–85. <https://doi.org/10.1007/BF00611249>.
- Einhorn, Z., Trapani, J.G., Liu, Q., and Nicolson, T. (2012). Rabconnectin3 $\alpha$  Promotes Stable Activity of the H<sup>+</sup> Pump on Synaptic Vesicles in Hair Cells. *J. Neurosci.* 32, 11144–11156. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1705-12.2012>.
- Eisenstein, R.S. (2000). Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annual review of nutrition*, 20, 627
- Evans, E.F. (1972). The frequency response and other properties of single fibres in the guinea-pig cochlear nerve. *The Journal of Physiology* 226, 263–287. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1972.sp009984>.
- Fang, X., Cai, Z., Wang, H., Han, D., Cheng, Q., Zhang, P., Gao, F., Yu, Y., Song, Z., Wu, Q., et al. (2020). Loss of Cardiac Ferritin H Facilitates Cardiomyopathy via Slc7a11-Mediated Ferroptosis. *Circ Res* 127, 486–501. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316509>.
- Fang Xuexian, Cai Zhaoxian, Wang Hao, Han Dan, Cheng Qi, Zhang Pan, Gao Feng, Yu Yingying, Song Zijun, Wu Qian, et al. (2020). Loss of Cardiac Ferritin H Facilitates Cardiomyopathy via Slc7a11-Mediated Ferroptosis. *Circulation Research* 127, 486–501. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316509>.
- Feng, H., Schorpp, K., Jin, J., Yozwiak, C.E., Hoffstrom, B.G., Decker, A.M., Rajbhandari, P., Stokes, M.E., Bender, H.G., Csuka, J.M., et al. (2020). Transferrin Receptor Is a Specific Ferroptosis Marker. *Cell Rep* 30, 3411–3423.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.049>.

- Ferreira, C., Bucchini, D., Martin, M.E., Levi, S., Arosio, P., Grandchamp, B., and Beaumont, C. (2000). Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. *J Biol Chem* 275, 3021–3024. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3021>.
- Fettiplace, R. (2017). Hair Cell Transduction, Tuning, and Synaptic Transmission in the Mammalian Cochlea. In *Comprehensive Physiology*, (American Cancer Society), pp. 1197–1227.
- Fettiplace, R. (2020). Diverse Mechanisms of Sound Frequency Discrimination in the Vertebrate Cochlea. *Trends in Neurosciences* 43, 88–102. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.12.003>.
- Fettiplace, R., and Kim, K.X. (2014). The Physiology of Mechanoelectrical Transduction Channels in Hearing. *Physiological Reviews* 94, 951–986. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2013>.
- Fleming, M.D., Trenor, C.C., Su, M.A., Foernzler, D., Beier, D.R., Dietrich, W.F., and Andrews, N.C. (1997). Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* 16, 383–386. <https://doi.org/10.1038/ng0897-383>.
- Fleming, M.D., Romano, M.A., Su, M.A., Garrick, L.M., Garrick, M.D., and Andrews, N.C. (1998). Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: Evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 1148–1153. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.3.1148>.
- Flores, E.N., Duggan, A., Madathany, T., Hogan, A.K., Márquez, F.G., Kumar, G., Seal, R.P., Edwards, R.H., Liberman, M.C., and García-Añoveros, J. (2015). A Non-canonical Pathway from Cochlea to Brain Signals Tissue-Damaging Noise. *Current Biology* 25, 606–612. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.009>.
- Frank, T., Rutherford, M.A., Strenzke, N., Neef, A., Pangršič, T., Khimich, D., Fejtova, A., Gundelfinger, E.D., Liberman, M.C., Harke, B., et al. (2010). Bassoon and the Synaptic Ribbon Organize Ca<sup>2+</sup> Channels and Vesicles to Add Release Sites and Promote Refilling. *Neuron* 68, 724–738. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.027>.
- Friedmann Angeli, J.P., Schneider, M., Proneth, B., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Hammond, V.J., Herbach, N., Aichler, M., Walch, A., Eggenhofer, E., et al. (2014). Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol* 16, 1180–1191. <https://doi.org/10.1038/ncb3064>.
- Fuchs, P.A. (2005). Time and intensity coding at the hair cell's ribbon synapse. *The Journal of Physiology* 566, 7–12. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.082214>.
- Furness, D.N., Katori, Y., Mahendrasingam, S., and Hackney, C.M. (2005). Differential distribution of  $\beta$ - and  $\gamma$ -actin in guinea-pig cochlear sensory and supporting cells. *Hearing Research* 207, 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2005.05.006>.
- Gale, J.E., Piazza, V., Ciubotaru, C.D., and Mammano, F. (2004). A Mechanism for Sensing Noise Damage in the Inner Ear. *Current Biology* 14, 526–529. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.03.002>.
- Gao, M., Monian, P., Pan, Q., Zhang, W., Xiang, J., and Jiang, X. (2016). Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Res* 26, 1021–1032. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.95>.
- Ge, J., Elferich, J., Dehghani-Ghahnaviyeh, S., Zhao, Z., Meadows, M., von Gersdorff, H., Tajkhorshid, E., and Gouaux, E. (2021). Molecular mechanism of prestin electromotive signal amplification. *Cell* 184, 4669–4679.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.034>.

- Giese, A.P.J., Tang, Y.-Q., Sinha, G.P., Bowl, M.R., Goldring, A.C., Parker, A., Freeman, M.J., Brown, S.D.M., Riazuddin, S., Fettiplace, R., et al. (2017). CIB2 interacts with TMC1 and TMC2 and is essential for mechanotransduction in auditory hair cells. *Nat Commun* 8, 43. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00061-1>.
- Gillespie, P.G., and Müller, U. (2009). Mechanotransduction by Hair Cells: Models, Molecules, and Mechanisms. *Cell* 139, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.010>.
- Gold, T. (1948). Hearing. II. The physical basis of the action of the cochlea. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 135, 492–498. <https://doi.org/10.1098/rspb.1948.0025>.
- Goutman, J.D., and Glowatzki, E. (2007). Time course and calcium dependence of transmitter release at a single ribbon synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 16341–16346. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705756104>.
- Gratton, M.A., Schmiedt, R.A., and Schulte, B.A. (1996). Age-related decreases in endocochlear potential are associated with vascular abnormalities in the stria vascularis. *Hear Res* 102, 181–190. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(96\)90017-9](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(96)90017-9).
- Graydon, C.W., Cho, S., Li, G.-L., Kachar, B., and Gersdorff, H. von (2011). Sharp Ca<sup>2+</sup> Nanodomains beneath the Ribbon Promote Highly Synchronous Multivesicular Release at Hair Cell Synapses. *J. Neurosci.* 31, 16637–16650. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1866-11.2011>.
- Graydon, C.W., Zhang, J., Oesch, N.W., Sousa, A.A., Leapman, R.D., and Diamond, J.S. (2014). Passive Diffusion as a Mechanism Underlying Ribbon Synapse Vesicle Release and Resupply. *J. Neurosci.* 34, 8948–8962. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1022-14.2014>.
- Gregory, F.D., Bryan, K.E., Pangršič, T., Calin-Jageman, I.E., Moser, T., and Lee, A. (2011). Harmonin inhibits presynaptic Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in mouse inner hair cells. *Nat Neurosci* 14, 1109–1111. <https://doi.org/10.1038/nn.2895>.
- Guillet, M., Sendin, G., Bourien, J., Puel, J.-L., and Nouvian, R. (2016). Actin Filaments Regulate Exocytosis at the Hair Cell Ribbon Synapse. *J. Neurosci.* 36, 649–654. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3379-15.2016>.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., and Hediger, M.A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388, 482–488. <https://doi.org/10.1038/41343>.
- Haile, D.J., Hentze, M.W., Rouault, T.A., Harford, J.B., and Klausner, R.D. (1989). Regulation of interaction of the iron-responsive element binding protein with iron-responsive RNA elements. *Molecular and Cellular Biology* 9, 5055–5061. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.11.5055-5061.1989>.
- Hakizimana, P., and Fridberger, A. (2021). Inner hair cell stereocilia are embedded in the tectorial membrane. *Nature communications*, 12(1), 1-13.
- Hakuba, N., Koga, K., Gyo, K., Usami, S., and Tanaka, K. (2000). Exacerbation of Noise-Induced Hearing Loss in Mice Lacking the Glutamate Transporter GLAST. *J. Neurosci.* 20, 8750–8753. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-23-08750.2000>.
- Hallermann, S., Fejtova, A., Schmidt, H., Weyhermüller, A., Silver, R.A., Gundelfinger, E.D., and Eilers, J. (2010). Bassoon Speeds Vesicle Reloading at a Central Excitatory Synapse. *Neuron* 68, 710–723. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.026>.

- He, W., Kemp, D., and Ren, T. (2018). Timing of the reticular lamina and basilar membrane vibration in living gerbil cochleae. *ELife* 7, e37625. <https://doi.org/10.7554/eLife.37625>.
- Hentze, M.W., Caughman, S.W., Rouault, T.A., Barriocanal, J.G., Dancis, A., Harford, J.B., and Klausner, R.D. (1987). Identification of the Iron-Responsive Element for the Translational Regulation of Human Ferritin mRNA. *Science* 238, 1570–1573. <https://doi.org/10.1126/science.3685996>.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., and Andrews, N.C. (2004). Balancing Acts: Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism. *Cell* 117, 285–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00343-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00343-5).
- Hibino, H., Horio, Y., Inanobe, A., Doi, K., Ito, M., Yamada, M., Gotow, T., Uchiyama, Y., Kawamura, M., Kubo, T., et al. (1997). An ATP-Dependent Inwardly Rectifying Potassium Channel, KAB-2 (Kir4.1), in Cochlear Stria Vascularis of Inner Ear: Its Specific Subcellular Localization and Correlation with the Formation of Endocochlear Potential. *J. Neurosci.* 17, 4711–4721. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-12-04711.1997>.
- Holt, M., Cooke, A., Neef, A., and Lagnado, L. (2004). High Mobility of Vesicles Supports Continuous Exocytosis at a Ribbon Synapse. *Current Biology* 14, 173–183. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.12.053>.
- Hou, W., Xie, Y., Song, X., Sun, X., Lotze, M.T., Zeh, H.J., Kang, R., and Tang, D. (2016). Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin. *Autophagy* 12, 1425–1428. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1187366>.
- Howard, J., and Hudspeth, A.J. (1988). Compliance of the hair bundle associated with gating of mechano-electrical transduction channels in the Bullfrog's saccular hair cell. *Neuron* 1, 189–199. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90139-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90139-0).
- Iancu, T.C. (1992). Ferritin and hemosiderin in pathological tissues. *Electron Microscopy Reviews* 5, 209–229. [https://doi.org/10.1016/0892-0354\(92\)90011-E](https://doi.org/10.1016/0892-0354(92)90011-E).
- Ikeda, K., and Morizono, T. (1989). Electrochemical profiles for monovalent ions in the stria vascularis: Cellular model of ion transport mechanisms. *Hearing Research* 39, 279–286. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(89\)90047-6](https://doi.org/10.1016/0378-5955(89)90047-6).
- Imai, H., Matsuoka, M., Kumagai, T., Sakamoto, T., and Koumura, T. (2017). Lipid Peroxidation-Dependent Cell Death Regulated by GPx4 and Ferroptosis. In *Apoptotic and Non-Apoptotic Cell Death*, S. Nagata, and H. Nakano, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 143–170.
- Irimia-Dominguez, J., Sun, C., Li, K., Muhoberac, B. B., Hallinan, G. I., Garringer, H. J., ... & Vidal, R. (2020). Cryo-EM structures and functional characterization of homo- and heteropolymers of human ferritin variants. *Scientific reports*, 10(1), 1-10.
- Ito, T., Li, X., Kurima, K., Choi, B.Y., Wangemann, P., and Griffith, A.J. (2014). Slc26a4-Insufficiency Causes Fluctuating Hearing Loss and Stria Vascularis Dysfunction. *Neurobiol Dis* 66, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.02.002>.
- Iwai, K., Drake, S.K., Wehr, N.B., Weissman, A.M., LaVaute, T., Minato, N., Klausner, R.D., Levine, R.L., and Rouault, T.A. (1998). Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: Implications for degradation of oxidized proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 4924–4928. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.4924>.

- Jackman, S.L., Choi, S.-Y., Thoreson, W.B., Rabl, K., Bartoletti, T.M., and Kramer, R.H. (2009). Role of the synaptic ribbon in transmitting the cone light response. *Nat Neurosci* 12, 303–310. <https://doi.org/10.1038/nn.2267>.
- Jaffrey, S.R., Haile, D.J., Klausner, R.D., and Harford, J.B. (1993). The interaction between the iron-responsive element binding protein and its cognate RNA is highly dependent upon both RNA sequence and structure. *Nucleic Acids Research* 21, 4627–4631. <https://doi.org/10.1093/nar/21.19.4627>.
- Jean, P., Lopez de la Morena, D., Michanski, S., Jaime Tobón, L.M., Chakrabarti, R., Picher, M.M., Neef, J., Jung, S., Gültas, M., Maxeiner, S., et al. (2018). The synaptic ribbon is critical for sound encoding at high rates and with temporal precision. *ELife* 7, e29275. <https://doi.org/10.7554/eLife.29275>.
- Jia, Y., Zhao, Y., Kusakizako, T., Wang, Y., Pan, C., Zhang, Y., Nureki, O., Hattori, M., and Yan, Z. (2020). TMC1 and TMC2 Proteins Are Pore-Forming Subunits of Mechanosensitive Ion Channels. *Neuron* 105, 310-321.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.10.017>.
- Jiang, L., Kon, N., Li, T., Wang, S.-J., Su, T., Hibshoosh, H., Baer, R., and Gu, W. (2015). Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature* 520, 57–62. <https://doi.org/10.1038/nature14344>.
- Jiang, X., Stockwell, B.R., and Conrad, M. (2021). Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 266–282. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00324-8>.
- Jing, Z., Rutherford, M.A., Takago, H., Frank, T., Fejtova, A., Khimich, D., Moser, T., and Strenzke, N. (2013). Disruption of the Presynaptic Cytomatrix Protein Bassoon Degrades Ribbon Anchorage, Multiquantal Release, and Sound Encoding at the Hair Cell Afferent Synapse. *J. Neurosci.* 33, 4456–4467. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3491-12.2013>.
- Johnson, S.L., Marcotti, W., and Kros, C.J. (2005). Increase in efficiency and reduction in Ca<sup>2+</sup> dependence of exocytosis during development of mouse inner hair cells. *The Journal of Physiology* 563, 177–191. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.074740>.
- Johnson, S.L., Beurg, M., Marcotti, W., and Fettiplace, R. (2011). Prestin-Driven Cochlear Amplification Is Not Limited by the Outer Hair Cell Membrane Time Constant. *Neuron* 70, 1143–1154. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.024>.
- Joshi, Y., Petit, C.P., Miot, S., Guillet, M., Sendin, G., Bourien, J., Wang, J., Pujol, R., El Mestikawy, S., Puel, J., et al. (2021). VGLUT3-p.A211V variant fuses stereocilia bundles and elongates synaptic ribbons. *J Physiol JP282181*. <https://doi.org/10.1113/JP282181>.
- Jung, S., Oshima-Takago, T., Chakrabarti, R., Wong, A.B., Jing, Z., Yamanbaeva, G., Picher, M.M., Wojcik, S.M., Göttfert, F., Predoehl, F., et al. (2015). Rab3-interacting molecules 2 $\alpha$  and 2 $\beta$  promote the abundance of voltage-gated CaV1.3 Ca<sup>2+</sup> channels at hair cell active zones. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, E3141–E3149. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417207112>.
- Kachar, B., Parakkal, M., Kurc, M., Zhao, Y., and Gillespie, P.G. (2000). High-resolution structure of hair-cell tip links. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 13336–13341. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.24.13336>.
- Kato, J., Fujikawa, K., Kanda, M., Fukuda, N., Sasaki, K., Takayama, T., Kobune, M., Takada, K., Takimoto, R., Hamada, H., et al. (2001). A Mutation, in the Iron-Responsive Element of H Ferritin



- mRNA, Causing Autosomal Dominant Iron Overload. *The American Journal of Human Genetics* 69, 191–197. <https://doi.org/10.1086/321261>.
- Kawashima, Y., Géléoc, G.S.G., Kurima, K., Labay, V., Lelli, A., Asai, Y., Makishima, T., Wu, D.K., Santana, C.C.D., Holt, J.R., et al. (2011). Mechanotransduction in mouse inner ear hair cells requires transmembrane channel–like genes. *J Clin Invest* 121, 4796–4809. <https://doi.org/10.1172/JCI60405>.
- Kazmierczak, P., Sakaguchi, H., Tokita, J., Wilson-Kubalek, E.M., Milligan, R.A., Müller, U., and Kachar, B. (2007). Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature* 449, 87–91. <https://doi.org/10.1038/nature06091>.
- Kemp, D.T. (1978). Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *The Journal of the Acoustical Society of America* 64, 1386–1391. <https://doi.org/10.1121/1.382104>.
- Khimich, D., Nouvian, R., Pujol, R., tom Dieck, S., Egner, A., Gundelfinger, E.D., and Moser, T. (2005). Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature* 434, 889–894. <https://doi.org/10.1038/nature03418>.
- Knirsch, M., Brandt, N., Braig, C., Kuhn, S., Hirt, B., Münkner, S., Knipper, M., and Engel, J. (2007). Persistence of Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> Channels in Mature Outer Hair Cells Supports Outer Hair Cell Afferent Signaling. *J. Neurosci.* 27, 6442–6451. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5364-06.2007>.
- Knutson, M., Oukka, M., Aydemir, F., and Wessling-Resnick, M. (2005). Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin.
- Koschak, A., Reimer, D., Huber, I., Grabner, M., Glossmann, H., Engel, J., and Striessnig, J. (2001).  $\alpha$ 1D (Cav1.3) Subunits Can Form L-type Ca<sup>2+</sup> Channels Activating at Negative Voltages \*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 22100–22106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101469200>.
- Kros, C.J., and Crawford, A.C. (1990). Potassium currents in inner hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *The Journal of Physiology* 421, 263–291. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1990.sp017944>.
- Kubota, A., Hida, A., Ichikawa, Y., Momose, Y., Goto, J., Igeta, Y., Hashida, H., Yoshida, K., Ikeda, S.-I., Kanazawa, I., et al. (2009). A novel ferritin light chain gene mutation in a Japanese family with neuroferritinopathy: description of clinical features and implications for genotype-phenotype correlations. *Mov Disord* 24, 441–445. <https://doi.org/10.1002/mds.22435>.
- Kujawa, S.G., and Liberman, M.C. (2009). Adding Insult to Injury: Cochlear Nerve Degeneration after “Temporary” Noise-Induced Hearing Loss. *J. Neurosci.* 29, 14077–14085. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2845-09.2009>.
- Kumar, N., Rizek, P., and Jog, M. (2016). Neuroferritinopathy: Pathophysiology, Presentation, Differential Diagnoses and Management. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)* 6, 355. <https://doi.org/10.7916/D8KK9BHF>.
- Kurima, K., Ebrahim, S., Pan, B., Sedlacek, M., Sengupta, P., Millis, B.A., Cui, R., Nakanishi, H., Fujikawa, T., Kawashima, Y., et al. (2015). TMC1 and TMC2 Localize at the Site of Mechanotransduction in Mammalian Inner Ear Hair Cell Stereocilia. *Cell Reports* 12, 1606–1617. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.058>.

- Lang, F., Vallon, V., Knipper, M., and Wangemann, P. (2007). Functional significance of channels and transporters expressed in the inner ear and kidney. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 293, C1187–C1208. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00024.2007>.
- Laufberger. (1937). Sur la Cristallisation de la Ferritine. *Bull.Soe. Chim. Bio.* 19, 1575-1582
- Legent, F., Bordure, P., Calais, C., and Garnier, S. (2011). *Audiologie pratique - Audiométrie | Livre | 9782294708350*.
- Lei, P., Bai, T., and Sun, Y. (2019). Mechanisms of Ferroptosis and Relations With Regulated Cell Death: A Review. *Frontiers in Physiology* 10, 139. .
- Leibold, E.A., and Munro, H.N. (1988). Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved sequence in the 5' untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 2171–2175. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.7.2171>.
- Lenzi, D., Runyeon, J.W., Crum, J., Ellisman, M.H., and Roberts, W.M. (1999). Synaptic Vesicle Populations in Saccular Hair Cells Reconstructed by Electron Tomography. *J. Neurosci.* 19, 119–132. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-01-00119.1999>.
- Lenzi, D., Crum, J., Ellisman, M.H., and Roberts, W.M. (2002). Depolarization Redistributes Synaptic Membrane and Creates a Gradient of Vesicles on the Synaptic Body at a Ribbon Synapse. *Neuron* 36, 649–659. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01025-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01025-5).
- Levi, S., and Arosio, P. (2004). Mitochondrial ferritin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 1887–1889. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.10.020>.
- Levi, S., Corsi, B., Bosisio, M., Invernizzi, R., Volz, A., Sanford, D., Arosio, P., and Drysdale, J. (2001). A Human Mitochondrial Ferritin Encoded by an Intronless Gene. *Journal of Biological Chemistry* 276, 24437–24440. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100141200>.
- Li, A., Ségui, J., Heinemann, S.H., and Hoshi, T. (1998). Oxidation Regulates Cloned Neuronal Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Channels Expressed in Xenopus Oocytes. *J. Neurosci.* 18, 6740–6747. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-17-06740.1998>.
- Li, G.-L., Keen, E., Andor-Ardó, D., Hudspeth, A.J., and Gersdorff, H. von (2009). The Unitary Event Underlying Multiquantal EPSCs at a Hair Cell's Ribbon Synapse. *J. Neurosci.* 29, 7558–7568. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0514-09.2009>.
- Li, W., Garringer, H.J., Goodwin, C.B., Richine, B., Acton, A., VanDuyn, N., Muhoberac, B.B., Irimia-Dominguez, J., Chan, R.J., Peacock, M., et al. (2015). Systemic and Cerebral Iron Homeostasis in Ferritin Knock-Out Mice. *PLoS ONE* 10, e0117435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117435>.
- Lieberman, M.C. (1980). Morphological differences among radial afferent fibers in the cat cochlea: An electron-microscopic study of serial sections. *Hearing Research* 3, 45–63. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(80\)90007-6](https://doi.org/10.1016/0378-5955(80)90007-6).
- Lieberman, M.C. (1982). Single-Neuron Labeling in the Cat Auditory Nerve. *Science*, 216(4551), 1239-1241.
- Lieberman, L.D., Wang, H., and Liberman, M.C. (2011). Opposing Gradients of Ribbon Size and AMPA Receptor Expression Underlie Sensitivity Differences among Cochlear-Nerve/Hair-Cell Synapses. *J. Neurosci.* 31, 801–808. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3389-10.2011>.

- Lieberman, M.C., Gao, J., He, D.Z.Z., Wu, X., Jia, S., and Zuo, J. (2002). Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature* *419*, 300–304. <https://doi.org/10.1038/nature01059>.
- Liu, C., Glowatzki, E., and Fuchs, P.A. (2015). Unmyelinated type II afferent neurons report cochlear damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *112*, 14723–14727. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515228112>.
- Logiudice, L., Sterling, P., and Matthews, G. (2009). Vesicle recycling at ribbon synapses in the finely branched axon terminals of mouse retinal bipolar neurons. *Neuroscience* *164*, 1546–1556. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.09.023>.
- Mammano, F., and Ashmore, J.F. (1996). Differential expression of outer hair cell potassium currents in the isolated cochlea of the guinea-pig. - Mammano - 1996.
- Mancuso, M., Davidzon, G., Kurlan, R.M., Tawil, R., Bonilla, E., Di Mauro, S., and Powers, J.M. (2005). Hereditary ferritinopathy: a novel mutation, its cellular pathology, and pathogenetic insights. *J Neuropathol Exp Neurol* *64*, 280–294. <https://doi.org/10.1093/jnen/64.4.280>.
- Massover, W.H. (1993). Ultrastructure of ferritin and apoferritin: A review. *Micron* *24*, 389–437. [https://doi.org/10.1016/0968-4328\(93\)90005-L](https://doi.org/10.1016/0968-4328(93)90005-L).
- Maxeiner, S., Luo, F., Tan, A., Schmitz, F., and Südhof, T.C. (2016). How to make a synaptic ribbon: RIBEYE deletion abolishes ribbons in retinal synapses and disrupts neurotransmitter release. *The EMBO Journal* *35*, 1098–1114. <https://doi.org/10.15252/embj.201592701>.
- McKie, A.T. (2008). The role of Dcytb in iron metabolism: an update. *Biochemical Society Transactions* *36*, 1239–1241. <https://doi.org/10.1042/BST0361239>.
- McKie, A.T., Marciari, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T.J., Farzaneh, F., et al. (2000). A Novel Duodenal Iron-Regulated Transporter, IREG1, Implicated in the Basolateral Transfer of Iron to the Circulation. *Molecular Cell* *5*, 299–309. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80425-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80425-6).
- Mehta, B., Snellman, J., Chen, S., Li, W., and Zenisek, D. (2013). Synaptic Ribbons Influence the Size and Frequency of Miniature-like Evoked Postsynaptic Currents. *Neuron* *77*, 516–527. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.11.024>.
- Meng, J., Li, S., Zhang, F., Li, Q., and Qin, Z. (2016). Cochlear Size and Shape Variability and Implications in Cochlear Implantation Surgery. *Otology & Neurotology* *37*, 1307–1313. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000001189>.
- Merchan-Perez, A., and Liberman, M.C. (1996). Ultrastructural differences among afferent synapses on cochlear hair cells: Correlations with spontaneous discharge rate. *Journal of Comparative Neurology* *371*, 208–221. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960722\)371:2<208::AID-CNE2>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960722)371:2<208::AID-CNE2>3.0.CO;2-6).
- Meyer, A.C., and Moser, T. (2010). Structure and function of cochlear afferent innervation: Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery *18*, 441–446. <https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e32833e0586>.
- Meyer, A.C., Frank, T., Khimich, D., Hoch, G., Riedel, D., Chapochnikov, N.M., Yarin, Y.M., Harke, B., Hell, S.W., Egner, A., et al. (2009). Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. *Nat Neurosci* *12*, 444–453. <https://doi.org/10.1038/nn.2293>.

- Michalski, N., Michel, V., Bahloul, A., Lefèvre, G., Barral, J., Yagi, H., Chardenoux, S., Weil, D., Martin, P., Hardelin, J.-P., et al. (2007). Molecular Characterization of the Ankle-Link Complex in Cochlear Hair Cells and Its Role in the Hair Bundle Functioning. *J. Neurosci.* *27*, 6478–6488. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0342-07.2007>.
- Michalski, N., Goutman, J.D., Auclair, S.M., Boutet de Monvel, J., Tertrais, M., Emptoz, A., Parrin, A., Nouaille, S., Guillon, M., Sachse, M., et al. (2017). Otoferlin acts as a Ca<sup>2+</sup> sensor for vesicle fusion and vesicle pool replenishment at auditory hair cell ribbon synapses. *ELife* *6*, e31013. <https://doi.org/10.7554/eLife.31013>.
- Michanski, S., Smaluch, K., Steyer, A.M., Chakrabarti, R., Setz, C., Oestreicher, D., Fischer, C., Möbius, W., Moser, T., Vogl, C., et al. (2019). Mapping developmental maturation of inner hair cell ribbon synapses in the apical mouse cochlea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *116*, 6415–6424. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812029116>.
- Michel, V., Booth, K.T., Patni, P., Petit, C., and El-Amraoui, A. (2017). CIB2, defective in isolated deafness, is key for auditory hair cell mechanotransduction and survival. *EMBO Molecular Medicine* *9*, 1711–1731. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708087>.
- Minowa, O., Ikeda, K., Sugitani, Y., Oshima, T., Nakai, S., Katori, Y., Suzuki, M., Furukawa, M., Kawase, T., Zheng, Y., et al. (1999). Altered Cochlear Fibrocytes in a Mouse Model of DFN3 Nonsyndromic Deafness. *Science* *285*, 1408–1411. <https://doi.org/10.1126/science.285.5432.1408>.
- Montcouquiol, M., and Kelley, M.W. (2020). Development and Patterning of the Cochlea: From Convergent Extension to Planar Polarity. *Cold Spring Harb Perspect Med* *10*, a033266. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033266>.
- Moore, D.R., Fuchs, P.A., Rees, A., Palmer, A.R., and Plack, C.J. (2010). *The Oxford Handbook of Auditory Science: The auditory brain* (Oxford University Press).
- Moser, T., and Beutner, D. (2000). Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *97*, 883–888. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.883>.
- Moser, T., and Starr, A. (2016). Auditory neuropathy — neural and synaptic mechanisms. *Nature Reviews Neurology* *12*, 135–149. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.10>.
- Moser, T., Grabner, C.P., and Schmitz, F. (2019). Sensory Processing at Ribbon Synapses in the Retina and the Cochlea. *Physiological Reviews* *100*, 103–144. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2018>.
- Muhoberac, B.B., and Vidal, R. (2013). Abnormal iron homeostasis and neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* *5*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00032>.
- Muhoberac, B.B., and Vidal, R. (2019). Iron, Ferritin, Hereditary Ferritinopathy, and Neurodegeneration. *Front Neurosci* *13*, 1195. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01195>.
- Müller, M., Hünerbein, K. von, Hoidis, S., and Smolders, J.W.T. (2005). A physiological place–frequency map of the cochlea in the CBA/J mouse. *Hearing Research* *202*, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2004.08.011>.
- Nemeth, E., Powelson, J., Donovan, A., Vaughn, M.B., and Ward, D.M. (2004). Hcpidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization.

- Ni, W., Li, H.-F., Zheng, Y.-C., and Wu, Z.-Y. (2016). FTL mutation in a Chinese pedigree with neuroferritinopathy. *Neurol Genet* 2, e74. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000074>.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A., and Vaulont, S. (2001). Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8780–8785. <https://doi.org/10.1073/pnas.151179498>.
- Nin, F., Hibino, H., Doi, K., Suzuki, T., Hisa, Y., and Kurachi, Y. (2008). The endocochlear potential depends on two K<sup>+</sup> diffusion potentials and an electrical barrier in the stria vascularis of the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1751–1756. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711463105>.
- Nishida, K., Garringer, H.J., Futamura, N., Funakawa, I., Jinnai, K., Vidal, R., and Takao, M. (2014). A novel ferritin light chain mutation in neuroferritinopathy with an atypical presentation. *J Neurol Sci* 342, 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.03.060>.
- Nouvian, R., Beutner, D., Parsons, T.D., and Moser, T. (2006). Structure and Function of the Hair Cell Ribbon Synapse. *J Membrane Biol* 209, 153–165. <https://doi.org/10.1007/s00232-005-0854-4>.
- Nouvian, R., Neef, J., Bulankina, A.V., Reisinger, E., Pangršič, T., Frank, T., Sikorra, S., Brose, N., Binz, T., and Moser, T. (2011). Exocytosis at the hair cell ribbon synapse apparently operates without neuronal SNARE proteins. *Nat Neurosci* 14, 411–413. <https://doi.org/10.1038/nn.2774>.
- Ó Maoiléidigh, D., and Ricci, A.J. (2019). A Bundle of Mechanisms: Inner-Ear Hair-Cell Mechanotransduction. *Trends in Neurosciences* 42, 221–236. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.12.006>.
- Obholzer, N., Wolfson, S., Trapani, J.G., Mo, W., Nechiporuk, A., Busch-Nentwich, E., Seiler, C., Sidi, S., Sollner, C., Duncan, R.N., et al. (2008). Vesicular Glutamate Transporter 3 Is Required for Synaptic Transmission in Zebrafish Hair Cells. *Journal of Neuroscience* 28, 2110–2118. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5230-07.2008>.
- Ohgami, R.S., Campagna, D.R., Greer, E.L., Antiochos, B., McDonald, A., Chen, J., Sharp, J.J., Fujiwara, Y., Barker, J.E., and Fleming, M.D. (2005). Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet* 37, 1264–1269. <https://doi.org/10.1038/ng1658>.
- Ohlemiller, K.K. (2009). Mechanisms and Genes in Human Strial Presbycusis from Animal Models. *Brain Res* 1277, 70–83. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.02.079>.
- Ohn, T.-L., Rutherford, M.A., Jing, Z., Jung, S., Duque-Afonso, C.J., Hoch, G., Picher, M.M., Scharinger, A., Strenzke, N., and Moser, T. (2016). Hair cells use active zones with different voltage dependence of Ca<sup>2+</sup> influx to decompose sounds into complementary neural codes. *PNAS* 113, E4716–E4725. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605737113>.
- Ohta, E., Nagasaka, T., Shindo, K., Toma, S., Nagasaka, K., Ohta, K., and Shiozawa, Z. (2008). Neuroferritinopathy in a Japanese family with a duplication in the ferritin light chain gene. *Neurology* 70, 1493–1494. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000310428.74624.95>.
- Oliver, D., Taberner, A.M., Thurm, H., Sausbier, M., Arntz, C., Ruth, P., Fakler, B., and Liberman, M.C. (2006). The Role of BKCa Channels in Electrical Signal Encoding in the Mammalian Auditory Periphery. *J. Neurosci.* 26, 6181–6189. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1047-06.2006>.
- Onerci, M.T. (2010). *Diagnosis in Otorhinolaryngology* (Springer).

- Orino, K., Lehman, L., TSUJI, Y., AYAKI, H., TORTI, S.V., and TORTI, F.M. (2001). Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochemical Journal* 357, 241–247. <https://doi.org/10.1042/bj3570241>.
- Ory-Magne, F., Brefel-Courbon, C., Payoux, P., Debruxelles, S., Sibon, I., Goizet, C., Labauge, P., Menegon, P., Uro-Coste, E., Ghetti, B., et al. (2009). Clinical phenotype and neuroimaging findings in a French family with hereditary ferritinopathy (FTL498-499InsTC). *Mov Disord* 24, 1676–1683. <https://doi.org/10.1002/mds.22669>.
- Özçete, Ö.D., and Moser, T. (2020). A sensory cell diversifies its output by varying Ca<sup>2+</sup> influx-release coupling among active zones. *The EMBO Journal* *n/a*, e106010. <https://doi.org/10.15252/embj.2020106010>.
- Palmer, A.R., and Russell, I.J. (1986). Phase-locking in the cochlear nerve of the guinea-pig and its relation to the receptor potential of inner hair-cells. *Hearing Research* 24, 1–15. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(86\)90002-X](https://doi.org/10.1016/0378-5955(86)90002-X).
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.019>.
- Pan, B., Akyuz, N., Liu, X.-P., Asai, Y., Nist-Lund, C., Kurima, K., Derfler, B.H., György, B., Limapichat, W., Walujkar, S., et al. (2018). TMC1 Forms the Pore of Mechanosensory Transduction Channels in Vertebrate Inner Ear Hair Cells. *Neuron* 99, 736-753.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.033>.
- Pangršič, T., Lasarow, L., Reuter, K., Takago, H., Schwander, M., Riedel, D., Frank, T., Tarantino, L.M., Bailey, J.S., Strenzke, N., et al. (2010). Hearing requires otoferlin-dependent efficient replenishment of synaptic vesicles in hair cells. *Nat Neurosci* 13, 869–876. <https://doi.org/10.1038/nn.2578>.
- Payne, S.A., Joens, M.S., Chung, H., Skigen, N., Frank, A., Gattani, S., Vaughn, K., Schwed, A., Nester, M., Bhattacharyya, A., et al. (2021). Maturation of Heterogeneity in Afferent Synapse Ultrastructure in the Mouse Cochlea. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 13. .
- Pelliccia, P., VENAIL, F., BONAFÉ, A., MAKEIEFF, M., IANNETTI, G., BARTOLOMEO, M., and MONDAIN, M. (2014). Cochlea size variability and implications in clinical practice. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 34, 42–49. .
- Petitpré, C., Wu, H., Sharma, A., Tokarska, A., Fontanet, P., Wang, Y., Helmbacher, F., Yackle, K., Silberberg, G., Hadjab, S., et al. (2018). Neuronal heterogeneity and stereotyped connectivity in the auditory afferent system. *Nat Commun* 9, 3691. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06033-3>.
- Petitpré, C., Bourien, J., Wu, H., Diuba, A., Puel, J.-L., and Lallemand, F. (2020). Genetic and functional diversity of primary auditory afferents. *Current Opinion in Physiology* 18, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2020.09.011>.
- Picard, E., Ranchon-Cole, I., Jonet, L., Beaumont, C., Behar-Cohen, F., Courtois, Y., and Jeanny, J.-C. (2011). Light-Induced Retinal Degeneration Correlates with Changes in Iron Metabolism Gene Expression, Ferritin Level, and Aging. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52, 1261–1274. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5705>.
- Picher, M.M., Oprişoreanu, A.-M., Jung, S., Michel, K., Schoch, S., and Moser, T. (2017). Rab Interacting Molecules 2 and 3 Directly Interact with the Pore-Forming CaV1.3 Ca<sup>2+</sup> Channel Subunit and Promote Its Membrane Expression. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11. .

- Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., and Striessnig, J. (2000). Congenital Deafness and Sinoatrial Node Dysfunction in Mice Lacking Class D L-Type Ca<sup>2+</sup> Channels. *Cell* *102*, 89–97. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00013-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00013-1).
- Puel, J.L., Bledsoe, S.C., Bobbin, R.P., Ceasar, G., and Fallon, M. (1989). Comparative actions of salicylate on the amphibian lateral line and guinea pig cochlea. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol* *93*, 73–80. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(89\)90013-3](https://doi.org/10.1016/0742-8413(89)90013-3).
- Puel, J.L., Bobbin, R.P., and Fallon, M. (1990). Salicylate, mefenamate, meclofenamate, and quinine on cochlear potentials. *Otolaryngol Head Neck Surg* *102*, 66–73. <https://doi.org/10.1177/019459989010200110>.
- Pujol, R., Lavigne-Rebillard, M., and Lenoir, M. (1998). Development of Sensory and Neural Structures in the Mammalian Cochlea. In *Development of the Auditory System*, E.W. Rubel, A.N. Popper, and R.R. Fay, eds. (New York, NY: Springer), pp. 146–192.
- Pyott, S.J., Glowatzki, E., Trimmer, J.S., and Aldrich, R.W. (2004). Extrasynaptic Localization of Inactivating Calcium-Activated Potassium Channels in Mouse Inner Hair Cells. *J. Neurosci.* *24*, 9469–9474. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3162-04.2004>.
- Reynolds, E.S. (1963). THE USE OF LEAD CITRATE AT HIGH pH AS AN ELECTRON-OPAQUE STAIN IN ELECTRON MICROSCOPY. *J Cell Biol* *17*, 208–212. .
- Ricci, A.J., Crawford, A.C., and Fettiplace, R. (2003). Tonotopic Variation in the Conductance of the Hair Cell Mechanotransducer Channel. *Neuron* *40*, 983–990. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00721-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00721-9).
- Richardson, G.P., de Monvel, J.B., and Petit, C. (2011). How the genetics of deafness illuminates auditory physiology. *Annu Rev Physiol* *73*, 311–334. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142228>.
- Richter, G.W. (1978). The iron-loaded cell--the cytopathology of iron storage. A review. *Am J Pathol* *91*, 362–404. .
- Rickheit, G., Maier, H., Strenzke, N., Andreescu, C.E., De Zeeuw, C.I., Muenscher, A., Zdebik, A.A., and Jentsch, T.J. (2008). Endocochlear potential depends on Cl<sup>-</sup> channels: mechanism underlying deafness in Bartter syndrome IV. *EMBO J* *27*, 2907–2917. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.203>.
- Robertson, D. (1984). Horseradish peroxidase injection of physiologically characterized afferent and efferent neurones in the guinea pig spiral ganglion. *Hearing Research* *15*, 113–121. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(84\)90042-X](https://doi.org/10.1016/0378-5955(84)90042-X).
- Rogers, J., and Munro, H. (1987). Translation of ferritin light and heavy subunit mRNAs is regulated by intracellular chelatable iron levels in rat hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *84*, 2277–2281. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.8.2277>.
- Rose, J.E., Brugge, J.F., Anderson, D.J., and Hind, J.E. (1967). Phase-locked response to low-frequency tones in single auditory nerve fibers of the squirrel monkey. *Journal of Neurophysiology* *30*, 769–793. <https://doi.org/10.1152/jn.1967.30.4.769>.
- Roux, I., Safieddine, S., Nouvian, R., Grati, M., Simmler, M.-C., Bahloul, A., Perfettini, I., Le Gall, M., Rostaing, P., Hamard, G., et al. (2006). Otoferlin, Defective in a Human Deafness Form, Is Essential for Exocytosis at the Auditory Ribbon Synapse. *Cell* *127*, 277–289. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.040>.

- Rucker, P., Torti, F.M., and Torti, S.V. (1996). Role of H and L Subunits in Mouse Ferritin ". *Journal of Biological Chemistry* 271, 33352–33357. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.52.33352>.
- Ruel, J., Emery, S., Nouvian, R., Bersot, T., Amilhon, B., Van Rybroek, J.M., Rebillard, G., Lenoir, M., Eybalin, M., Delprat, B., et al. (2008). Impairment of SLC17A8 Encoding Vesicular Glutamate Transporter-3, VGLUT3, Underlies Nonsyndromic Deafness DFNA25 and Inner Hair Cell Dysfunction in Null Mice. *The American Journal of Human Genetics* 83, 278–292. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.07.008>.
- Russel, I.J., and Sellick, P.M. (1978). Intracellular studies of hair cells in the mammalian cochlea. *The Journal of Physiology*, 284(1), 261-290.
- Rutherford, M.A., and Roberts, W.M. (2006). Frequency selectivity of synaptic exocytosis in frog saccular hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 2898–2903. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511005103>.
- Ryan, A., and Dallos, P. (1975). Effect of absence of cochlear outer hair cells on behavioural auditory threshold. *Nature* 253, 44–46. <https://doi.org/10.1038/253044a0>.
- Salt, A.N., Mlechar, I., and Thalmann, R. (1987). Mechanisms of endocochlear potential generation by stria vascularis. *The Laryngoscope* 97, 984–991. <https://doi.org/10.1288/00005537-198708000-00020>.
- Santos-Sacchi, J., and Marovitz, W.F. (1985). A ferritin-containing cell type in the stria vascularis of the mouse inner ear. *Acta Otolaryngol* 100, 26–32. <https://doi.org/10.3109/00016488509108583>.
- Santos-Sacchi, J., and Tan, W. (2018). The Frequency Response of Outer Hair Cell Voltage-Dependent Motility Is Limited by Kinetics of Prestin. *J. Neurosci.* 38, 5495–5506. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0425-18.2018>.
- Santos-Sacchi, J., and Tan, W. (2019). Voltage Does Not Drive Prestin (SLC26a5) Electro-Mechanical Activity at High Frequencies Where Cochlear Amplification Is Best. *IScience* 22, 392–399. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.11.036>.
- Santos-Sacchi, J., Iwasa, K.H., and Tan, W. (2019). Outer hair cell electromotility is low-pass filtered relative to the molecular conformational changes that produce nonlinear capacitance. *Journal of General Physiology* 151, 1369–1385. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812280>.
- Sato, H., Sando, I., and Takahashi, H. (1991). Sexual Dimorphism and Development of the Human Cochlea: Computer 3-D Measurement. *Acta Oto-Laryngologica* 111, 1037–1040. <https://doi.org/10.3109/00016489109100753>.
- Schmitz, F., Königstorfer, A., and Südhof, T.C. (2000). RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron* 28, 857–872. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)00159-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)00159-8).
- Schnee, M.E., Lawton, D.M., Furness, D.N., Benke, T.A., and Ricci, A.J. (2005). Auditory Hair Cell-Afferent Fiber Synapses Are Specialized to Operate at Their Best Frequencies. *Neuron* 47, 243–254. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.06.004>.
- Schnee, M.E., Santos-Sacchi, J., Castellano-Muñoz, M., Kong, J.-H., and Ricci, A.J. (2011). Calcium-Dependent Synaptic Vesicle Trafficking Underlies Indefatigable Release at the Hair Cell Afferent Fiber Synapse. *Neuron* 70, 326–338. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.031>.



- Schrauwen, I., Helfmann, S., Inagaki, A., Predoehl, F., Tabatabaiefar, M.A., Picher, M.M., Sommen, M., Zazo Seco, C., Oostrik, J., Kremer, H., et al. (2012). A Mutation in CABP2, Expressed in Cochlear Hair Cells, Causes Autosomal-Recessive Hearing Impairment. *The American Journal of Human Genetics* 91, 636–645. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.08.018>.
- Schulte, B.A., and Schmiedt, R.A. (1992). Lateral wall Na, K-ATPase and endocochlear potentials decline with age in quiet-reared gerbils. *Hearing Research* 61, 35–46. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(92\)90034-K](https://doi.org/10.1016/0378-5955(92)90034-K).
- Schwarz, K., Natarajan, S., Kassas, N., Vitale, N., and Schmitz, F. (2011). The Synaptic Ribbon Is a Site of Phosphatidic Acid Generation in Ribbon Synapses. *J. Neurosci.* 31, 15996–16011. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2965-11.2011>.
- Seal, R.P., Akil, O., Yi, E., Weber, C.M., Grant, L., Yoo, J., Clause, A., Kandler, K., Noebels, J.L., Glowatzki, E., et al. (2008). Sensorineural Deafness and Seizures in Mice Lacking Vesicular Glutamate Transporter 3. *Neuron* 57, 263–275. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.032>.
- Seiler, A., Schneider, M., Förster, H., Roth, S., Wirth, E.K., Culmsee, C., Plesnila, N., Kremmer, E., Rådmark, O., Wurst, W., et al. (2008). Glutathione Peroxidase 4 Senses and Translates Oxidative Stress into 12/15-Lipoxygenase Dependent- and AIF-Mediated Cell Death. *Cell Metabolism* 8, 237–248. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.07.005>.
- Shrestha, B.R., Chia, C., Wu, L., Kujawa, S.G., Liberman, M.C., and Goodrich, L.V. (2018). Sensory Neuron Diversity in the Inner Ear Is Shaped by Activity. *Cell* 174, 1229-1246.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.007>.
- Siemens, J., Lillo, C., Dumont, R.A., Reynolds, A., Williams, D.S., Gillespie, P.G., and Müller, U. (2004). Cadherin 23 is a component of the tip link in hair-cell stereocilia. *Nature* 428, 950–955. <https://doi.org/10.1038/nature02483>.
- Smith, A.G., Carthew, P., Francis, J.E., Edwards, R.E., and Dinsdale, D. (1990). Characterization and accumulation of ferritin in hepatocyte nuclei of mice with iron overload. *Hepatology* 12, 1399–1405. <https://doi.org/10.1002/hep.1840120622>.
- Snellman, J., Mehta, B., Babai, N., Bartoletti, T.M., Akmentin, W., Francis, A., Matthews, G., Thoreson, W., and Zenisek, D. (2011). Acute destruction of the synaptic ribbon reveals a role for the ribbon in vesicle priming. *Nat Neurosci* 14, 1135–1141. <https://doi.org/10.1038/nn.2870>.
- Söllner, C., Rauch, G.-J., Siemens, J., Geisler, R., Schuster, S.C., Müller, U., and Nicolson, T. (2004). Mutations in cadherin 23 affect tip links in zebrafish sensory hair cells. *Nature* 428, 955–959. <https://doi.org/10.1038/nature02484>.
- Sotomayor, M., Corey, D.P., and Schulten, K. (2005). In Search of the Hair-Cell Gating Spring: Elastic Properties of Ankyrin and Cadherin Repeats. *Structure* 13, 669–682. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.03.001>.
- Sotomayor, M., Weihofen, W.A., Gaudet, R., and Corey, D.P. (2010). Structural Determinants of Cadherin-23 Function in Hearing and Deafness. *Neuron* 66, 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.03.028>.
- Sotomayor, M., Weihofen, W.A., Gaudet, R., and Corey, D.P. (2012). Structure of a force-conveying cadherin bond essential for inner-ear mechanotransduction. *Nature* 492, 128–132. <https://doi.org/10.1038/nature11590>.

- Spassova, M.A., Avissar, M., Furman, A.C., Crumling, M.A., Saunders, J.C., and Parsons, T.D. (2004). Evidence That Rapid Vesicle Replenishment of the Synaptic Ribbon Mediates Recovery from Short-Term Adaptation at the Hair Cell Afferent Synapse. *JARO* 5, 376–390. <https://doi.org/10.1007/s10162-004-5003-8>.
- Spitzer, M.W., and Semple, M.N. (1995). Neurons sensitive to interaural phase disparity in gerbil superior olive: diverse monaural and temporal response properties. *Journal of Neurophysiology* 73, 1668–1690. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.73.4.1668>.
- Spoendlin, H. (1972). Innervation Densities of the Cochlea. *Acta Oto-Laryngologica* 73, 235–248. <https://doi.org/10.3109/00016487209138937>.
- Spoendlin, H., and Brun, J.-P. (1974). The block-surface technique for evaluation of cochlear pathology. *Arch Otorhinolaryngol* 208, 137–145. <https://doi.org/10.1007/BF00453927>.
- Storti, E., Cortese, F., Di Fabio, R., Fiorillo, C., Pierallini, A., Tessa, A., Valleriani, A., Pierelli, F., Santorelli, F.M., and Casali, C. (2013). De novo FTL mutation: a clinical, neuroimaging, and molecular study. *Mov Disord* 28, 252–253. <https://doi.org/10.1002/mds.25275>.
- Sun, S., Babola, T., Pregernig, G., So, K.S., Nguyen, M., Su, S.-S.M., Palermo, A.T., Bergles, D.E., Burns, J.C., and Müller, U. (2018). Hair Cell Mechanotransduction Regulates Spontaneous Activity and Spiral Ganglion Subtype Specification in the Auditory System. *Cell* 174, 1247-1263.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.008>.
- Surel, C., Guillet, M., Lenoir, M., Bourien, J., Sendin, G., Joly, W., Delprat, B., Lesperance, M.M., Puel, J.-L., and Nouvian, R. (2016). Remodeling of the Inner Hair Cell Microtubule Meshwork in a Mouse Model of Auditory Neuropathy AUNA1. *ENeuro* 3, ENEURO.0295-16.2016. <https://doi.org/10.1523/ENeuro.0295-16.2016>.
- Syka, J. (1997). *Acoustical Signal Processing in the Central Auditory System* (Springer Science & Business Media).
- Tang, Y.-Q., Lee, S.A., Rahman, M., Vanapalli, S.A., Lu, H., and Schafer, W.R. (2020). Ankyrin Is An Intracellular Tether for TMC Mechanotransduction Channels. *Neuron* 107, 112-125.e10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.03.026>.
- Theil, E.C. (1987). Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 289–315. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.001445>.
- Thompson, K.J., Fried, M.G., Ye, Z., Boyer, P., and Connor, J.R. (2002). Regulation, mechanisms and proposed function of ferritin translocation to cell nuclei. *J Cell Sci* 115, 2165–2177. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.10.2165>.
- Thomson, A.M., Rogers, J.T., and Leedman, P.J. (1999). Iron-regulatory proteins, iron-responsive elements and ferritin mRNA translation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31, 1139–1152. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00080-1).
- Thong, J.F., Low, D., Tham, A., Liew, C., Tan, T.Y., and Yuen, H.W. (2017). Cochlear duct length—one size fits all? *American Journal of Otolaryngology* 38, 218–221. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2017.01.015>.

- 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. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.08.110192.001353>.
- Tobin, M., Chaiyasitdhi, A., Michel, V., Michalski, N., and Martin, P. (2019). Stiffness and tension gradients of the hair cell's tip-link complex in the mammalian cochlea. *ELife* 8, e43473. <https://doi.org/10.7554/eLife.43473>.
- Torti, S.V., and Torti, F.M. (2013). Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer* 13, 342–355. <https://doi.org/10.1038/nrc3495>.
- Trowe, M.-O., Maier, H., Petry, M., Schweizer, M., Schuster-Gossler, K., and Kispert, A. (2011). Impaired stria vascularis integrity upon loss of E-cadherin in basal cells. *Dev Biol* 359, 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.08.030>.
- Vaithianathan, T., Henry, D., Akmentin, W., and Matthews, G. Nanoscale dynamics of synaptic vesicle trafficking and fusion at the presynaptic active zone. *ELife* 5, e13245. <https://doi.org/10.7554/eLife.13245>.
- Vavakou, A., Cooper, N.P., and van der Heijden, M. (2019). The frequency limit of outer hair cell motility measured in vivo. *ELife* 8, e47667. <https://doi.org/10.7554/eLife.47667>.
- Vidal, R., Ghetti, B., Takao, M., Brefel-Courbon, C., Uro-Coste, E., Glazier, B.S., Siani, V., Benson, M.D., Calvas, P., Miravalle, L., et al. (2004). Intracellular ferritin accumulation in neural and extraneural tissue characterizes a neurodegenerative disease associated with a mutation in the ferritin light polypeptide gene. *J Neuropathol Exp Neurol* 63, 363–380. <https://doi.org/10.1093/jnen/63.4.363>.
- Vincent, P.F.Y., Bouleau, Y., Charpentier, G., Emptoz, A., Safieddine, S., Petit, C., and Dulon, D. (2017). Different CaV1.3 Channel Isoforms Control Distinct Components of the Synaptic Vesicle Cycle in Auditory Inner Hair Cells. *J Neurosci* 37, 2960–2975. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2374-16.2017>.
- Vincent, P.F.Y., Cho, S., Tertrais, M., Bouleau, Y., Gersdorff, H. von, and Dulon, D. (2018). Clustered Ca<sup>2+</sup> Channels Are Blocked by Synaptic Vesicle Proton Release at Mammalian Auditory Ribbon Synapses. *Cell Reports* 25, 3451-3464.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.072>.
- Von Békésy, G. (1928). Zur Theorie des Hörens: Die Schwingungsform der Basilarmembran G. 793-810. .
- Von Békésy, G. (1960). *Experiments in hearing* (New York: McGraw-Hill) 1899-1972.
- Wang, J., and Puel, J.-L. (2018). Toward Cochlear Therapies. *Physiological Reviews* 98, 2477–2522. <https://doi.org/10.1152/physrev.00053.2017>.
- Wang, J., Pignol, B., Chabrier, P.-E., Saido, T., Lloyd, R., Tang, Y., Lenoir, M., and Puel, J.-L. (2007). A novel dual inhibitor of calpains and lipid peroxidation (BN82270) rescues the cochlea from sound trauma. *Neuropharmacology* 52, 1426–1437. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.02.007>.
- Wang, W., Knovich, M.A., Coffman, L.G., Torti, F.M., and Torti, S.V. (2010). Serum ferritin: Past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1800, 760–769. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.03.011>.
- Wangemann, P. (2002). K<sup>+</sup> cycling and the endocochlear potential. *Hear Res* 165, 1–9. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(02\)00279-4](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(02)00279-4).

- Weisz, C., Glowatzki, E., and Fuchs, P. (2009). The postsynaptic function of type II cochlear afferents. *Nature* 461, 1126–1129. <https://doi.org/10.1038/nature08487>.
- Weisz, C.J.C., Williams, S.-P.G., Eckard, C.S., Divito, C.B., Ferreira, D.W., Fantetti, K.N., Dettwyler, S.A., Cai, H.-M., Rubio, M.E., Kandler, K., et al. (2021). Outer Hair Cell Glutamate Signaling through Type II Spiral Ganglion Afferents Activates Neurons in the Cochlear Nucleus in Response to Nondamaging Sounds. *J. Neurosci.* 41, 2930–2943. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0619-20.2021>.
- West, C.D. (1985). The relationship of the spiral turns of the cochlea and the length of the basilar membrane to the range of audible frequencies in ground dwelling mammals. *The Journal of the Acoustical Society of America* 77, 1091–1101. <https://doi.org/10.1121/1.392227>.
- Wilkinson, N., and Pantopoulos, K. (2014). The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. *Frontiers in Pharmacology* 5. .
- Wong, A.B., Jing, Z., Rutherford, M.A., Frank, T., Strenzke, N., and Moser, T. (2013). Concurrent Maturation of Inner Hair Cell Synaptic Ca<sup>2+</sup> Influx and Auditory Nerve Spontaneous Activity around Hearing Onset in Mice. *J. Neurosci.* 33, 10661–10666. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1215-13.2013>.
- Worwood, M., Brook, J.D., Cragg, S.J., Hellkuhl, B., Jones, B.M., Perera, P., Roberts, S.H., and Shaw, D.J. (1985). Assignment of human ferritin genes to chromosomes 11 and 19q13.3→19qter. *Hum Genet* 69, 371–374. <https://doi.org/10.1007/BF00291657>.
- Xiong, W., Grillet, N., Elledge, H.M., Wagner, T.F.J., Zhao, B., Johnson, K.R., Kazmierczak, P., and Müller, U. (2012). TMHS Is an Integral Component of the Mechanotransduction Machinery of Cochlear Hair Cells. *Cell* 151, 1283–1295. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.041>.
- Yang, W.S., and Stockwell, B.R. (2016). Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends in Cell Biology* 26, 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.014>.
- Yang, W.S., SriRamaratnam, R., Welsch, M.E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V.S., Cheah, J.H., Clemons, P.A., Shamji, A.F., Clish, C.B., et al. (2014). Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4. *Cell* 156, 317–331. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.010>.
- Yasunaga, S., Grati, M., Cohen-Salmon, M., El-Amraoui, A., Mustapha, M., Salem, N., El-Zir, E., Loiselet, J., and Petit, C. (1999). A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet* 21, 363–369. <https://doi.org/10.1038/7693>.
- Yoon, S.H., Kim, N.Y., Kim, Y.J., and Lyoo, C.H. (2019). Novel Ferritin Light Chain Gene Mutation in a Korean Patient with Neuroferritinopathy. *J Mov Disord* 12, 63–65. <https://doi.org/10.14802/jmd.18062>.
- Zenisek, D., Steyer, J.A., and Almers, W. (2000). Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature* 406, 849–854. <https://doi.org/10.1038/35022500>.
- Zenisek, D., Horst, N.K., Merrifield, C., Sterling, P., and Matthews, G. (2004). Visualizing Synaptic Ribbons in the Living Cell. *J. Neurosci.* 24, 9752–9759. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2886-04.2004>.
- Zhang, K.D., and Coate, T.M. (2017). Recent advances in the development and function of type II spiral ganglion neurons in the mammalian inner ear. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 65, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.09.017>.

Zhao, B., Wu, Z., Grillet, N., Yan, L., Xiong, W., Harkins-Perry, S., and Müller, U. (2014). TMIE Is an Essential Component of the Mechanotransduction Machinery of Cochlear Hair Cells. *Neuron* 84, 954–967. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.10.041>.

Zheng, W., and Holt, J.R. (2021). The Mechanosensory Transduction Machinery in Inner Ear Hair Cells. *Annu Rev Biophys* 50, 31–51. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062420-081842>.

Zheng, L., Sekerkova, G., Vranich, K., Tilney, L.G., Mugnaini, E., and Bartles, J.R. (2000). The Deaf Jerker Mouse Has a Mutation in the Gene Encoding the Espin Actin-Bundling Proteins of Hair Cell Stereocilia and Lacks Espins.

## Résumé

### Rôle de la chaîne légère de la ferritine dans le codage sonore

La cochlée est l'organe de l'audition. Elle contient deux grands types de cellules sensorielles auditives, les cellules ciliées externes (CCE) qui amplifient les ondes sonores et sont responsables de la sélectivité en fréquence ; et les cellules ciliées internes (CCI) qui activent les fibres du nerf auditif à partir de la libération de leur neuromédiateur, le glutamate, à la fente synaptique. Pour assurer leurs rôles respectifs, les cellules ciliées sont coiffées par un faisceau de stéréocils qui détecte l'onde sonore. Les mécanismes nécessaires au maintien de l'activité des cellules ciliées restent en grande partie indéterminés. Ici, nous avons étudié le rôle de la ferritine, connue pour stocker le fer intracellulaire et prévenir ainsi la formation de radicaux hydroxyles, dans le codage de l'information sonore. Pour cela, nous avons examiné le phénotype des souris dont le gène codant la chaîne légère de la ferritine (FTL1) a été invalidé par recombinaison homologe. La mesure des potentiels évoqués auditifs montre des seuils auditifs similaires chez les souris de type sauvage et hétérozygote. En revanche, chez la souris homozygote knock-out, 20 % de la population présente une élévation des seuils auditifs, associée à une diminution des produits de distorsions des émissions oto-acoustiques, reflétant une baisse d'activité des CCE. En accord avec ces données fonctionnelles, l'observation morphologique des cochlées en microscopie électronique montre une dégénérescence des CCE et une altération des stéréocils des CCI. Bien que la perte de FTL1 n'ait pas modifié le nombre et la taille des rubans synaptiques des cellules ciliées, les mesures effectuées en patch-clamp montrent une plus grande proportion de CCI avec un courant calcique altéré chez les souris FTL1<sup>-/-</sup>. Ces résultats suggèrent que le maintien des cellules ciliées est tributaire de la ferritine. Cette dernière pourrait jouer un rôle dans la protection des cellules ciliées contre la formation de radicaux libres.

**Mots clés** : cochlée ; cellule ciliée ; ferritine ; surdité

## Abstract

### Role of the ferritin light chain in the sound coding

Hearing relies on two major kind of sensory auditory hair cells in the cochlea: the outer hair cells (OHCs), which amplify sound stimulation, and the inner hair cells (IHCs), which transduce sound stimulation into release of neurotransmitter. Thus, cochlear activity sets high demands on the cellular metabolism. Ferritin, which belongs to the iron-binding protein family, stores the intracellular iron, require for several metabolic processes. Here, we probed the role of ferritin in the cochlea by phenotyping the ferritin light-chain subunit knock-out mouse. Wild-type and heterozygous mice showed similar ABR and auditory thresholds. In contrast, in the FTL1 knock-out mouse, we found-out a threshold shift in 20% of the homozygous mice associated with the loss of the distortion product of otoacoustic emissions, reflecting the OHC's activity. Consistently, light and electron microscopy show a massive degeneration of the OHCs. In addition, we found-out splayed hair bundle in IHCs in the fraction of FTL1<sup>-/-</sup> with threshold shift. Although the loss of FTL1 did not change the number and size of the hair cell synaptic ribbons, we found-out a larger proportion of hair cells with altered calcium current in the FTL1<sup>-/-</sup> mice. We propose that ferritin may protect to some extent the hair cells and notably the ribbon synapse against iron-induced hydroxyl radicals.

**Key words**: cochlea; hair cells; ferritin; deafness