L'annuaire du Collège de France
Cours et travaux

114 | 2015
Annuaire du Collège de France 2013-2014

Génétique et physiologie cellulaire

Christine Petit

Édition électronique
URL : https://journals.openedition.org/annuaire-cdf/11902
DOI : 10.4000/annuaire-cdf.11902
ISBN : 978-2-7226-0448-3
ISSN : 2109-9227

Éditeur
Collège de France

Édition imprimée
Date de publication : 1 juillet 2015
Pagination : 309-329
ISBN : 978-2-7226-0414-8
ISSN : 0069-5580

Référence électronique
Christine Petit, « Génétique et physiologie cellulaire », *L'annuaire du Collège de France* [En ligne], 114 | 2015, mis en ligne le 23 mai 2016, consulté le 22 août 2022. URL : http://journals.openedition.org/annuaire-cdf/11902 ; DOI : https://doi.org/10.4000/annuaire-cdf.11902

Tous droits réservés

Génétique et physiologie cellulaire

M^me^ Christine PETIT, professeur

ENSEIGNEMENT : LE SYSTÈME AUDITIF FACE À SES AGRESSEURS

Cours [a]

Les agresseurs du système auditif : son, xénobiotiques, vieillissement... Aspects génétiques de la susceptibilité individuelle à ces agresseurs

Le premier cours (6 février 2014) a porté sur les agents agresseurs du système auditif et les avancées récentes concernant les mécanismes impliqués dans la susceptibilité à la surdité induite par les aminoglycosides. À côté des agents agresseurs du système auditif connus depuis longtemps, tels que le bruit, les aminoglycosides, le cisplatine, figurent depuis peu les opiacés et les opioïdes.

Les mécanismes de l'ototoxicité du cisplatine ont retenu notre attention. Ils font intervenir, dans les cellules sensorielles, un transporteur du cuivre, CTR1, et un transporteur des cations organiques, OCT2 (Thomas *et al.*, 2013). La toxicité du cisplatine met en jeu le canal de transduction mécano-électrique auditive, sans que l'on sache si cette dépendance se rapporte ou non au passage du cisplatine à travers ce canal. La susceptibilité génétique à la perte de l'audition liée au cisplatine a été associée à deux gènes codant pour des méthyltransférases, la thiopurine-S-méthyltransférase (TPMT) et la catéchol-O-méthyltransférase (COMT), impliquées dans le métabolisme des médicaments (Weinshilboum, 2006 ; Ross *et al.*, 2009). Toutefois, les résultats de cette étude pharmacogénomique n'ont pas encore été reproduits.

Depuis 1992, la perte de l'audition due aux aminoglycosides a été associée à des mutations dans l'ADN mitochondrial qui code pour l'ARN de la petite sous-unité du ribosome mitochondrial, l'ARN ribosomique 12S (Prezant *et al.*, 1992). La

a. Les enregistrements des cours sont disponibles en audio et en vidéo sur le site internet du Collège de France: http://www.college-de-france.fr/site/christine-petit/course-2013-2014.htm [NdÉ].

mutation la plus fréquente, A1555G, est présente à l'état homoplasmique chez environ un individu sur cinq cents. On la trouve associée à différents haplotypes mitochondriaux. En règle générale, elle n'a pas de traduction clinique chez le jeune enfant ; quand survient la perte auditive, elle est souvent asymétrique. En Chine, dans la région de Shanghai, où la prise d'aminoglycosides rendrait compte de 25 % des atteintes auditives du sujet jeune, cette mutation est retrouvée chez un quart de ces patients. Elle est aussi responsable de perte de l'audition chez certains individus pour lesquels on n'a pas connaissance d'une prise d'aminoglycosides. Du point de vue de l'évolution des espèces, la mitochondrie a pour origine la bactérie, pour laquelle la sensibilité aux aminoglycosides de la traduction des ARN messagers en protéines est connue et comprise depuis longtemps. Les erreurs de traduction sont provoquées par les aminoglycosides en se fixant sur l'ARN 16S de la petite sous-unité du ribosome bactérien. En conséquence, la mutation A1555G a été rapidement identifiée comme se situant au site de liaison des aminoglycosides, à proximité du site de liaison des ARN de transfert (ARNt). La surdité par prise d'aminoglycosides est expliquée par les erreurs de traduction que ces antibiotiques provoquent au sein des protéines codées par le génome mitochondrial, soit 13 protéines, impliquées pour la plupart dans la phosphorylation oxydative. En 2002 est découvert un nouveau facteur de transcription mitochondrial, TFB (McCulloch *et al.*, 2002), qui partage avec le facteur de transcription codé par le gène bactérien *KsgA* une activité méthyltransférase (utilisant la S-adénosyl-méthionine comme donneur de méthyl) agissant sur la traduction des ARN messagers en protéines. Ces deux facteurs sont donc impliqués dans la transcription et la traduction. TFB méthyle deux adénines très conservées à travers l'évolution, qui se situent sur l'ARN ribosomique mitochondrial 12S dans sa région 3', à proximité de la mutation A1555G. KsgA fait de même. Il méthyle ces deux mêmes adénines sur l'ARN ribosomique bactérien 16S. Les mutations qui inactivent le gène *KsgA* protègent cependant les bactéries contre les effets des aminoglycosides. Deux facteurs TFB, TFB1 et TFB2, sont présents chez les mammifères. Le facteur TFB1 humain a essentiellement une activité méthyltransférase, et exerce donc principalement un contrôle sur la traduction. Or la région génomique qui porte le gène *TFB1* se comporte comme un locus modificateur de l'expression phénotypique de la mutation A1555G chez les patients. Enfin, certains travaux indiquent que la mutation A1555G conduit à une hyperméthylation des deux adénines cibles de TFB1. Au total, la chaîne de réactions suivante paraît émerger : la mutation mitochondriale A1555G, à l'origine d'une hyperméthylation des deux adénines de l'ARN ribosomique mitochondrial 12S, affecte la biosynthèse des protéines mitochondriales.

À côté de l'effet des aminoglycosides sur la traduction des protéines dans la mitochondrie, effet exacerbé par la présence de la mutation A1555G, un effet *via* des espèces oxygénées activées, plus communément appelées par le nom qui leur est donné en anglais (*reactive oxygen species* ou ROS), a été récemment rapporté (Raimundo *et al.*, 2012). L'altération des protéines mitochondriales conduit à une augmentation de la production des ROS, suivie de l'activation du facteur proapoptotique E2F1 et de la voie de signalisation proapoptotique Rb-E2F1, conduisant à l'apoptose cellulaire.

Reste à comprendre comment, dans ce schéma, E2F1 perçoit l'augmentation des ROS. L'AMP kinase phosphoryle la protéine Rb, qui régule l'activité du facteur E2F1. L'AMP kinase est elle-même activée par une phosphorylation dépendante des ROS. La séquence d'événements proposée allant de la mutation A1555G à

l'hyperméthylation de l'ARN 12S, la production de ROS, et enfin la phosphorylation de l'AMP kinase activant le facteur E2F1, est en accord avec les résultats obtenus chez des souris transgéniques qui sur-expriment TFB1. Ces souris présentent une augmentation de l'expression protéique du facteur E2F1 dans la cochlée. Sa restriction à la cochlée pourrait expliquer la limitation de l'effet de la mutation A1555G à cet organe. Notons qu'au cours des dernières années, l'entrée cochléaire des aminoglycosides a été précisée en utilisant la gentamicine couplée à un composé fluorescent, injectée par voie intrapéritonéale.

Le métabolisme de l'oxygène et la toxicité des espèces oxygénées activées, plaque tournante de l'action de nombreux agresseurs

Le deuxième cours (6 mars 2014) a porté sur la signalisation redox. Après la mise en évidence du rôle des ROS dans les pertes auditives liées à l'administration d'aminoglycosides (et du cisplatine), ce cours s'est intéressé a un aspect nouveau des effets des espèces oxygénées, la signalisation redox.

Tandis que l'augmentation de O_2 déclenche une réponse adaptative qui implique la signalisation redox médiée principalement par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), sa faillite se traduit par la production de ROS, parmi lesquels des radicaux libres (tels que OH, O_2^-, RO_2), et des produits non-radicalaires (tels que H_2O_2, RO_2H) (Gardes-Albert *et al.*, 2003), conduisant au stress oxydant, caractérisé par des dommages cellulaires irréversibles. Longtemps, la signalisation redox a été masquée par l'effet des ROS sur toutes les macromolécules biologiques : ADN, protéines, et lipides. Découverte il y a une quinzaine d'années dans le champ de l'immunité, son caractère ubiquitaire a depuis été reconnu. H_2O_2 n'est pas à proprement parler une espèce réactive, car ce composé ne possède pas d'électrons non appariés. Son aptitude à la signalisation tire parti de cette absence de réactivité qui lui permet de diffuser, donc d'agir à distance. L'anion superoxyde (O_2^-) est considéré comme un messager potentiel de cette signalisation. Des données récentes suggèrent en effet qu'il pourrait, par inactivation d'un ensemble de protéines, conduire à l'activation de voies de signalisation qui, soit favoriserait l'adaptation à H_2O_2, soit déclencherait une première étape vers la mort cellulaire. La signalisation redox, mise en place lors du passage à la vie aérobie, a un rôle essentiel, comme en témoigne le fait que l'absence du glutathion, agent réducteur majeur de cette signalisation, est incompatible avec la vie.

H_2O_2 provient soit de la dismutation de O_2^- par les superoxyde dismutases (SOD), soit de l'activité de diverses oxydases. Les SOD sont au nombre de trois chez l'homme : deux sont du type CuZn-SOD, SOD1 (cytoplasmique et mitochondriale) et SOD3 (extracellulaire), et une est du type Mn-SOD, SOD2 (mitochondriale). Une variété d'oxydases produisent H_2O_2 : les oxydases des acides gras à longue chaîne et des acides gras branchés, situées dans le peroxysome, les oxydases de la xanthine et de l'hypoxanthine, dans le cytoplasme et le peroxysome, les monoamines oxydases, dans la mitochondrie…. O_2^-, quant à lui, est formé soit dans la mitochondrie par la capture par O_2 d'un électron provenant de l'activité des complexes mitochondriaux I et III, soit dans la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique par l'oxydation du NADPH par les NADPH oxydases (NOX et DUOX). La régulation de sa production dans la mitochondrie est mal connue. Il en est de même du rôle de l'O_2 disponible, puisque l'hypoxie aussi bien que l'hyperoxie conduisent à une production excessive de ROS.

H_2O_2 est réduit en H_2O par trois voies impliquant trois peroxydases différentes (Bindoli *et al.*, 2008) : les peroxyrédoxines (Prx) dépendantes des thiorédoxines (Trx), les glutathion peroxydases (GPx) dépendantes du cycle du glutathion (GSH), et la catalase située dans le peroxysome. Il y a compétition entre la dégradation d'H_2O_2 et son rôle dans la signalisation redox.

La signalisation redox consiste en la conversion réversible des résidus cystéines de protéines (plusieurs centaines) ou peptides, d'une forme réduite en une forme oxydée. On estime à 5 mM la concentration cellulaire des groupements thiols des protéines qui peuvent intervenir dans cette signalisation. Les changements conformationnels induits se traduisent par des modifications d'activité (augmentation ou diminution d'activité enzymatique, par exemple), de propriétés biophysiques (stabilité des protéines, par exemple), de localisation subcellulaire, et d'interaction moléculaire. En présence d'H_2O_2, le groupement thiol des cystéines sous forme d'anion thiol (Cys-S^-) ou de thiol protoné (Cys-SH) peut prendre une forme sulfénique (Cys-SOH) (Finkel, 2011). Cette conversion dépend de l'état des thiols (les anions thiols sont plus réactifs que les thiols protonés), et de la nature de la protéine ou du peptide qui les portent (la vitesse de conversion est très différente d'une protéine ou d'un peptide à l'autre). La forme sulfénique des thiols des cystéines peut conduire à un changement de l'activité catalytique de certaines enzymes ou de l'activité de facteurs de transcription impliqués dans la réponse au stress oxydant. Les cystéines sous forme sulfénique sont, de plus, des intermédiaires de la formation de ponts disulfures (intra- ou intermoléculaires), qui sont bien plus stables et jouent un rôle essentiel dans le repliement des protéines. La méthionine, autre acide aminé soufré, pourrait être à l'origine, elle aussi, d'un système redox. Cependant, sa vitesse d'oxydation est plus faible que celle de la cystéine. Des données récentes suggèrent que la polymérisation de l'actine et l'activité de CAMKII (*Ca^{2+}/Calmodulin-dependent kinase*) seraient régulées par l'oxydation de certaines de leurs méthionines. Le retour à l'état réduit (anion thiolate) des thiols des cystéines sous forme sulfénique ou de ponts disulfures requiert un agent réducteur, le glutathion, ou une activité enzymatique qui échange thiols oxydés et thiols réduits, qu'il s'agisse de celle de disulfure réductases, de thiorédoxines (Trx) ou de glutarédoxines (Grx). Grx et Trx ont des structures tridimensionnelles comparables. Ces petites molécules sont de puissants antioxydants ; elles possèdent dans leur site actif plusieurs motifs de type CXXC (C = cystéine et X = n'importe quel acide aminé), qui se comportent comme des détecteurs de l'état d'oxydation. Enfin, une oxydation plus poussée des formes sulféniques des cystéines conduit à des formes sulfiniques (SO_2H), dont la réversion fait appel à des sulfirédoxines, puis sulfoniques (SO_3H), un état d'oxydation irréversible qui altère les protéines.

La compréhension de cette signalisation redox n'en est qu'à ses débuts. Il reste de nombreuses questions à résoudre. En particulier, comment cette signalisation peut-elle être spécifique alors que l'agent de signalisation, H_2O_2, diffuse, y compris à travers les membranes, et peut interagir avec de multiples cibles ?

Pour répondre à ces interrogations, des sondes « bio-détectrices » redox utilisables en imagerie *in vivo* ont été développées. Elles permettent de suivre en temps réel, dans des conditions expérimentales d'intérêt, le statut redox des différents compartiments cellulaires : mitochondries, noyau, et cytoplasme. Nous avons vu comment ces outils ont permis de mettre au jour l'existence d'un dialogue entre la mitochondrie et le noyau, impliquant la signalisation redox. *In fine*, il se traduit par des modifications transcriptionnelles (Al-Mehdi *et al.*, 2012).

La signalisation par H_2O_2 opère directement sur une variété de cibles : (i) des enzymes, les Prx et les GPx (qui réduisent H_2O_2 en H_2O) et la tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) ; suite à la modification des thiols de leurs cystéines qui prennent une forme sulfénique, ces enzymes deviennent inactives. La cystéine cible de l'oxydation est située dans le site catalytique de PTP1B ; le récepteur sur lequel elle agit reste alors phosphorylé et actif ; cette cystéine peut être réactivée par une Trx. H_2O_2, en agissant aussi directement sur les Trx, a un effet sur les nombreuses cibles de ces dernières, parmi lesquelles p53, NFkB… ; (ii) des protéines impliquées dans le contrôle de la transcription ; on peut citer l'oxydation des cystéines de KEAP1, protéine qui retient le facteur de transcription NRF2 dans le cytoplasme ; sous l'effet de l'oxydation de ses cystéines sensibles au statut redox, KEAP1 libère NRF2, qui gagne alors le noyau ; après dimérisation avec la petite protéine MAF, il se fixe aux séquences promotrices, dites « éléments de réponse aux antioxydants » (AREs : *antioxidant response elements*), de gènes qui codent pour des antioxydants ; (iii) des protéases à cystéine (ATG-4, impliquée dans l'autophagie, par exemple) ; (iv) enfin, H_2O_2 oxyde le glutathion, qui a des effets sur les Grx (qui ont de nombreuses cibles), sur les glutathion S-transférases (qui catalysent la conjugaison du glutathion à des substrats endogènes ou exogènes) et les GPx. La compartimentation cellulaire joue un rôle essentiel dans la mise en œuvre et la régulation de ces diverses voies de signalisation. Enfin, les Prx réductases et les Trx réductases, nécessaires au maintien de ces deux peroxydases sous forme réduite, ont pour cofacteur NADPH, qui leur est fourni par la voie des pentoses phosphates et la respiration mitochondriale. Soulignons que plusieurs des enzymes sus-mentionnées portent une sélénocystéine, analogue sélénié de la cystéine dans lequel le groupement thiol est remplacé par un groupement sélénol. La sélénocystéine est le 21^{e} acide aminé. D'utilisation rare, il est codé par le codon stop UGA. Il est également oxydé par H_2O_2.

Les éléments ci-dessus sont à rapprocher de deux formes de surdité. L'une est une surdité isolée transmise sur le mode autosomique récessif, DFNB25, dont le gène responsable code pour GRXCR1, qui comporte un domaine de type Grx. L'autre est le syndrome de Wolfram, qui comporte une surdité associée à un diabète ; l'atteinte de ce gène est aussi responsable d'une surdité isolée dominante DFNA6/14/38. Le gène responsable code pour une protéine mitochondriale, Miner1, impliquée dans le statut redox des groupements thiols, la réponse cellulaire aux protéines non correctement repliées (*unfolded protein response*), et l'homéostasie calcique.

Détecteurs et effecteurs du stress oxydant : rôles dans le métabolisme et la signalisation. Le dialogue des organelles : la part des peroxysomes

Le troisième cours (13 mars 2014) a porté sur la place du peroxysome dans la signalisation redox, la biologie de cette organelle, et son dialogue avec les autres organelles ou compartiments cellulaires.

En 1966, Christian De Duve découvre le peroxysome, qu'il isole à partir du foie de rat, et il procède à sa caractérisation biochimique (De Duve & Baudhuin, 1966). Entouré d'une simple membrane, il est empli d'une matrice granulaire et abrite un corps cristallin dense aux électrons. L'article qui rapporte cette découverte comporte la démonstration de la présence dans cette organelle d'oxydases qui produisent H_2O_2, et d'une peroxydase, la catalase, qui dégrade H_2O_2, d'où l'appellation fonctionnelle qui lui est donnée. Huit ans plus tard, en 1974, Christian De Duve reçoit le prix Nobel pour cette découverte.

Les peroxysomes, organelles dépourvus d'acide nucléique, sont mis en évidence par la réaction peroxydasique de la catalase qui, en oxydant le 3,3'-diaminobenzidine, forme un précipité dense aux électrons. Ils ont une taille, une forme, et un contenu enzymatique qui varient considérablement d'un tissu à l'autre. Leur diamètre va de 0,1 à 0,5 micromètre dans les adipocytes, où ils sont principalement localisés à proximité des vésicules lipidiques. Le peroxysome est donc une organelle plastique.

Les peroxysomes sont présents dans toutes les cellules des eucaryotes (plantes, champignons, et animaux). La génétique humaine, en associant des maladies aux atteintes du peroxysome, a révélé l'importance de cette organelle dans la vie cellulaire. L'analyse génétique menée chez la levure et des champignons multicellulaires a permis de déchiffrer les mécanismes impliqués dans la formation du peroxysome et sa dégradation. Les peroxysomes sont impliqués dans le métabolisme lipidique, par l'oxydation des acides gras qu'ils effectuent, et dans le métabolisme oxydatif. Ils ont quelques caractéristiques qui paraissent spécifiques : ils peuvent importer dans leur matrice des protéines totalement repliées, et même des protéines oligomérisées, mais sont incapables de replier les protéines ; ils peuvent se former *de novo*. L'origine du peroxysome reste débattue : endosymbiotique pour certains (comme le sont les mitochondries ou les chloroplastes, et comme l'avait proposé Christian de Duve (De Duve, 1969), ou mitochondriale pour d'autres. Deux types de données sont à verser à ce débat : d'une part, comme sus-mentionné, l'existence d'une voie de synthèse *de novo* des peroxysomes, et d'autre part, le fait que peroxysome et mitochondrie partagent certaines fonctions (production et dégradation d'H_2O_2, oxydation des acides gras à longue chaîne, rôle de plateforme de signalisation dans l'immunité innée….) et composés essentiels à leur biogénèse (facteurs de transcription de la famille des *peroxysome proliferation-activated receptors* [PPAR], composés des machineries de fission de leurs précurseurs respectifs).

Les peroxysomes sont impliqués dans le métabolisme des lipides, leur synthèse et leur dégradation. Ils dégradent les acides gras à très longue chaîne (VLCFA) par la ß-oxydation, et les acides gras branchés (BCFA) par l'α-oxydation. Depuis 1996, on sait qu'ils sont impliqués dans la synthèse des lipides. À partir du cholestérol, ils synthétisent des phospholipides éthers qui entrent dans la composition de la myéline et des acides biliaires. Les VLCFA pénètrent dans le peroxysome grâce à un transporteur de type ABC, les BCFA et les intermédiaires de synthèse de la myéline et des acides biliaires grâce à la protéine PMP70.

On a longtemps attribué la ß-oxydation des acides gras à longue chaîne exclusivement à la mitochondrie. Les études menées chez des patients atteints du syndrome de Zellweger ont montré qu'à la biogenèse profondément altérée des peroxysomes (ne persistent que leur membrane) était associé un taux sanguin très élevé d'acides gras à longue chaîne et d'acides gras branchés (Schrader & Yoon, 2007). Le peroxysome prend en charge les VLCFA, et la mitochondrie les acides gras dont la longueur de la chaîne est moindre. Mitochondries et peroxysomes coopèrent donc dans la dégradation des acides gras à longue chaîne. En termes énergétiques, le comportement des deux organelles est très différent. La mitochondrie tire parti de l'énergie libérée par la dégradation des acides gras pour synthétiser l'ATP par couplage à la phosphorylation oxydative, tandis que le peroxysome dissipe cette énergie sous forme de chaleur.

Les facteurs de transcription de type PPAR (Lodhi & Semenkovich, 2014) sont des récepteurs nucléaires ; ils forment des hétérodimères avec le récepteur de l'acide rétinoïque. Les gènes dont ils contrôlent l'expression sont impliqués dans la formation

des adipocytes, le métabolisme des lipides, l'homéostasie des glucides, et la formation même des peroxysomes ; ils contrôlent en particulier l'expression des gènes *PEX*, qui codent pour les peroxynes, protéines essentielles à la biogénèse du peroxysome. Les séquences promotrices qui lient les facteurs PPAR ont été définies.

L'oxygène moléculaire est consommé dans trois compartiments cellulaires : la mitochondrie, le peroxysome, et le réticulum endoplasmique. Les oxydases des peroxysomes des mammifères conduisent toutes à la formation de H_2O_2 en transférant l'hydrogène de leurs substrats moléculaires respectifs à l'oxygène moléculaire ; la xanthine oxydase conduit de surcroît à la synthèse d'O_2^- (Schrader & Fahimi, 2006). La consommation d'O_2 par le peroxysome est considérable. Elle est estimée à 20 % de la consommation cellulaire d'O_2. Quant à la production d'H_2O_2 par le peroxysome, elle représenterait environ 35 % de la production cellulaire totale. Certains évoquent même la possibilité que le peroxysome constitue la source majeure d'H_2O_2 et des ROS dans les cellules. Parmi les enzymes du peroxysome, celles qui conduisent à la plus importante production de H_2O_2 sont, semble-t-il, celles qui sont impliquées dans la ß-oxydation des acides gras. Parmi les oxydases découvertes par Christian de Duve figurent des oxydases d'acides aminés « D » ; l'atteinte de la D-aminoacide oxydase du peroxysome a récemment été rapportée comme étant responsable d'une forme de sclérose latérale amyotrophique ; le modèle murin créé par inactivation du gène correspondant présente, comme les patients, une dégénérescence des motoneurones ; une accumulation de D-sérine dans la moelle épinière a été mise en évidence (Sasabe *et al.*, 2012). Or le récepteur NMDA du glutamate, principal neurotransmetteur des neurones pyramidaux, a pour co-agoniste la D-sérine, dont l'augmentation de la concentration conduirait donc à une hyperexcitabilité des motoneurones, ce qui provoquerait leur dégénérescence.

La dégradation de H_2O_2 dans le peroxysome repose, outre la catalase, sur des Prx (Prx1 et Prx5) dépendantes des Trx, une GPx, et une thiol peroxydase (PMP20). Lorsque la concentration d'O_2 s'élève, la taille des peroxysomes et leur concentration en enzymes qui abaissent la concentration d'H_2O_2 augmentent. Ainsi, lorsque des cellules de la lignée CHO sont incubées en présence d'une forte concentration d'O_2, le volume des peroxysomes double, la concentration de la catalase, de la GPx et des SOD, est multipliée par un facteur deux à quatre. Une voie de formation du peroxysome, qui passe par l'élongation d'un peroxysome préexistant, est dépendante du statut redox de la cellule (Smith & Aitchison, 2013).

La réponse des peroxysomes aux ROS est moins bien comprise. La régulation transcriptionnelle des gènes qui codent pour les enzymes antioxydantes associées au peroxysome est, elle aussi, mal connue. Elle ferait intervenir, selon les gènes, le facteur de transcription PPAR-α ou le facteur FOXO3a (*Forkhead box class O*).

En revanche, l'adressage des protéines au peroxysome est très étudié. Il faut distinguer celui des protéines matricielles et celui des protéines membranaires (Nagotu *et al.*, 2012 ; Lodhi & Semenkovich, 2014). Pour les premières interviennent des peroxynes. Les protéines matricielles sont reconnues par l'étiquette qu'elles portent, en anglais, *peroxysome targeting sequence* ou PTS : la séquence PTS1 est un tripeptide situé à leur extrémité C-terminale, tandis que la séquence PTS2 est située dans leur région N-terminale. La peroxyne 5 reconnaît PTS1, et la peroxyne 7, PTS2 ; elles prennent en charge les protéines correspondantes (Smith & Aitchison, 2013). Dans cette machinerie d'importation des protéines matricielles interviennent aussi d'autres peroxynes, parmi lesquelles la peroxyne 14, qui joue un rôle majeur. Arrimée à la peroxyne 5 (ou 7), la protéine matricielle pénètre à l'intérieur du

peroxysome par un pore composé d'autres peroxynes. La peroxyne 5 libère son cargo à l'intérieur de la matrice, puis retourne dans le cytoplasme où, soit elle subit une ubiquitination et est dégradée dans le protéasome, soit elle entre dans un nouveau cycle d'importation. Aujourd'hui, on connaît plus de trente peroxynes. L'activité de la peroxyne 5 est dépendante du statut redox (voir ci-dessous).

Le modèle qui a longtemps prévalu pour la synthèse des protéines de la membrane du peroxysome stipulait que, synthétisées sur des ribosomes libres, elles étaient ensuite adressées au peroxysome (Dimitrov *et al.*, 2013). On a ensuite découvert que certaines de ces protéines transitaient par le réticulum endoplasmique, une voie dont certains se demandent d'ailleurs aujourd'hui si elle ne serait pas la seule possible. En faveur de l'existence d'une double voie, certaines protéines de la membrane du peroxysome portent une étiquette, qui n'est pas totalement définie, mais dont on sait qu'elle est reconnue par la peroxyne 19, qui adresse ces protéines au peroxysome (Lodhi & Semenkovich, 2014).

Le rôle physiologique des ROS et leur production peroxysomale anormalement élevée dans un contexte pathologique ont été illustrés par la discussion d'un article concernant le rôle de la mélanocortine dans la prise alimentaire (Diano *et al.*, 2011). Parmi les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus, ceux qui synthétisent la pro-opiomélanocortine (POMC) et ceux qui synthétisent le neuropeptide NPY sont impliqués dans le comportement alimentaire. La stimulation des premiers induit une sensation de satiété conduisant à une diminution de la prise de nourriture, tandis que celle des seconds est orexigène (elle provoque une prise alimentaire). L'activité de ces deux types de neurones est dépendante des ROS (observations s'appuyant sur l'injection d'un composé (honokiol) qui piège les ROS dans les ventricules cérébraux). La baisse des ROS diminue l'activité des neurones POMC et stimule celle des neurones NPY. Ces modifications d'activité concourent à une augmentation de la prise de nourriture. L'hyperproduction locale de ROS par injection intra-ventriculaire d'H_2O_2 augmente l'activité des neurones POMC, et la prise de nourriture diminue. Les ROS ont ensuite été étudiés chez les souris *DIO* (*diet-induced obesity*), qui présentent une obésité due à une résistance à la leptine. Alors qu'en règle générale le taux des ROS et celui de la leptine varient parallèlement, chez les souris *DIO*, le taux de leptine est très élevé, mais celui des ROS dans les neurones POMC ne subit pas l'élévation attendue. La possibilité d'une faillite de l'induction des ROS chez les souris *DIO* a été examinée. Mitochondries et peroxysomes ont été étudiés. La comparaison de souris sauvages et de souris *DIO*, toutes deux suralimentées, ne montre pas, chez ces dernières, d'anomalie du nombre des mitochondries, tandis que le nombre des peroxysomes dans les neurones POMC est multiplié par trois. Cette prolifération des peroxysomes a pu être rapportée à l'augmentation des transcrits codant pour PPAR-γ. L'effet de PPAR-γ a été validé par l'utilisation d'un antagoniste de ce facteur de transcription, GW9662. Sous l'effet de cet antagoniste injecté dans les ventricules cérébraux, la prolifération des peroxysomes décroît, les ROS augmentent, et la prise alimentaire diminue. Si l'on injecte H_2O_2 en intra-ventriculaire chez ces souris, on observe aussi une augmentation des ROS et une diminution de la prise de nourriture. L'activité électrique des neurones POMC des souris *DIO* augmente sous l'effet de la baisse de PPAR-γ. L'ensemble des résultats est interprété de la façon suivante : les souris *DIO* présentent une élévation de PPAR-γ qui conduit à une prolifération des peroxysomes, entraînant une baisse des ROS qui, en réduisant l'activité des neurones POMC, conduit à l'accroissement de la prise alimentaire.

Enfin les ROS sont classiquement considérées comme des agents du vieillissement. Les preuves expérimentales venant à l'appui d'un rôle direct des ROS restent ténues. Pour certains, la faiblesse des arguments expérimentaux s'expliquerait par la complexité du système et la variété de ses substances tampons. Deux travaux qui tirent parti de la modulation de l'expression d'une catalase, l'un réalisé chez le nématode *C. elegans*, et l'autre chez la souris, apportent cependant des résultats qui plaident en faveur d'un rôle des ROS dans le vieillissement. Le nématode *C. elegans* possède trois catalases (Petriv & Rachubinski, 2004). La catalase 2, qui est exprimée dans le peroxysome, joue un rôle très important dans la réduction de H_2O_2 en H_2O. Chez un animal mutant, pour lequel l'expression de cette catalase est affectée, la durée de vie passe de 17 à environ 13 jours. Une diminution du nombre des œufs pondus, observée aussi lors du vieillissement normal, est décelée. Leurs peroxysomes sont nombreux, mais regroupés en agrégats, ce qui indique que leur fonctionnement est sans doute altéré. L'autre étude consiste en une surproduction de la catalase dans différents compartiments cellulaires : noyau, peroxysome, et mitochondrie (Schriner *et al.*, 2005). La surproduction de catalase dans le peroxysome ou le noyau est sans effet sur la longévité. En revanche, lorsque cette surproduction concerne la mitochondrie, un accroissement modeste mais significatif de la longévité est observé, qui s'accompagne d'un effet protecteur à l'égard des effets délétères d'H_2O_2.

Les moyens de défense : prévention et traitement

Le quatrième cours (20 mars 2014) a porté sur les moyens de défense du système auditif vis-à-vis de ses agresseurs, les traitements préventifs et curatifs.

Dans un premier temps, des compléments d'information sur la biogénèse et le fonctionnement des peroxysomes ont été apportés.

Le passage de protéines des peroxysomes vers d'autres compartiments cellulaires a été souligné et documenté : (i) la kinase ATM, défectueuse dans l'ataxie télangiectasie, jusqu'ici décrite comme présente dans le noyau, a récemment été trouvée associée au peroxysome ; (ii) la nicotinamidase, localisée dans le peroxysome, est aussi présente dans le cytoplasme et le noyau ; (iii) la glycérol-3-phosphate déshydrogénase dépendante du NAD, porteuse à son extrémité N-terminale de l'étiquette PTS2, et donc adressée à la matrice du peroxysome, est redirigée vers le noyau en cas de stress osmotique (la dynamique de localisation des protéines dans les divers compartiments cellulaires fait souvent partie intégrante de la réponse au stress).

Une excellente revue récente résume les voies de la biogenèse des peroxysomes (Smith & Aitchison, 2013). On notera que les peroxynes 11 α et ß sont toutes deux impliquées dans la formation des peroxysomes à partir d'un peroxysome préexistant. La peroxyne 11ß est nécessaire à la prolifération constitutive des peroxysomes (Schrader *et al.*, 1998). Sa surexpression provoque l'élongation des peroxysomes préexistants, qui sera suivie de leur fission. Les souris dont le gène correspondant est inactivé ne survivent pas. La peroxyne 11α a été impliquée dans la prolifération induite des peroxysomes. Récemment, le gène *Pex11*α a été inactivé (Weng *et al.*, 2013) : les souris sont viables, mais la prolifération des peroxysomes dans le foie normalement induite par un régime hypercalorique est défectueuse.

Le peroxysome, qui produit et dégrade les ROS, possède des détecteurs du statut redox de la cellule. Ils sont loin d'être tous identifiés. Parmi eux, on peut citer : la peroxyne 11ß, qui n'est active que sous forme réduite, monomérique (Marshall *et*

al., 1996), la GPx1 de la levure, peroxyrédoxine atypique (Ohdate & Inoue, 2012), ainsi qu'une Prx homologue de la Prx5 des mammifères (Bener Aksam *et al.*, 2008) ; la peroxyne 5 se comporte comme un détecteur redox, tant pour la charge de son cargo, que pour sa libération au sein du peroxysome (Bindoli *et al.*, 2008) : elle ne pourra libérer son cargo que si le milieu intérieur du peroxysome est réducteur. La peroxyne 5 possède trois résidus cystéine, dont la substitution par des résidus sérine a permis d'établir les rôles respectifs dans ces deux activités (Ma *et al.*, 2013). Notons que l'ubiquitination des protéines du peroxysome, qui détermine leur destin (dégradation ou recyclage), pourrait également dépendre du statut redox ; en effet celle de la peroxyne 5 a la particularité de se faire sur un résidu cystéine. Enfin, le vieillissement des peroxysomes paraît s'accompagner d'une baisse du pouvoir réducteur de leur contenu interne. On peut en rapprocher l'observation selon laquelle, durant l'établissement de fibroblastes en culture, ces cellules contiennent peu d'H_2O_2 lors des premiers passages, mais accumulent H_2O_2 après plusieurs passages (Legakis *et al.*, 2002).

Les maladies liées aux peroxysomes ont été brièvement discutées (Trompier *et al.*, 2014). Les maladies en rapport avec l'atteinte de la biogénèse des peroxysomes – syndrome de Zellweger, adrénoleucodystrophie néonatale, maladie de Refsum infantile, et chondrodysplasie ponctuée rhizomélique de type 1 – atteignent la migration des neurones durant le développement embryonnaire, la myélinisation des fibres nerveuses (Kassmann, 2014) et conduisent à une inflammation en rapport avec la surexpression de cytokines proinflammatoires (interleukine 1, TNFα…). Une atteinte auditive neurosensorielle est observée ; elle est attribuée aux défauts de la myélinisation, essentielle pour la précision temporelle de la propagation du signal sensoriel dans les voies auditives.

Le dialogue entre le peroxysome et la mitochondrie a aussi retenu notre attention (Dirkx *et al.*, 2005; Islinger *et al.*, 2012).

Les thérapies anti-oxydantes ont été discutées. La N-acétylcystéine peut réduire les ponts disulfures des protéines, mais elle entre en compétition dans cette fonction avec les thiorédoxines et les glutarédoxines, qui sont particulièrement efficaces. Son rôle serait en conséquence limité aux cystéines situées profondément dans les molécules, que ces enzymes ne pourraient atteindre en raison de leur taille. En revanche, la N-acétylcystéine a la capacité de bloquer la glutathionylation des cystéines et la création de ponts disulfures entre des cystéines sous forme sulfénique.

Pour protéger contre le stress oxydant, l'anti-oxydant le plus puissant est le glutathion. Les autres anti-oxydants sont le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium, et le fer, qui sont nécessaires à l'activité d'enzymes anti-oxydantes. Cependant, ils peuvent s'oxyder spontanément par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss, créant des radicaux hydroxyles. Parmi les anti-oxydants, on peut citer les ubiquinones et le cytochrome c. Les ubiquinones jouent un rôle dans la production des ROS, et protègent les lipides contre la peroxydation. Le cytochrome c aurait un effet dû à la capture des électrons libres de l'anion O_2^- dans la chaîne respiratoire mitochondriale. La vitamine E et la vitamine C agissent comme anti-oxydants. La vitamine E est liposoluble ; elle se fixe sur les membranes et séquestre les radicaux libres. La vitamine C est hydrosoluble ; elle peut capter H_2O_2 et les radicaux OH. La D-méthionine et l'ebsélène (C13H9NOSe) ont le même effet sur le stress oxydant.

Comme nous l'avons vu, les SOD préviennent la formation de l'anion O_2^- à l'origine d'H_2O_2. Dans une étude relativement ancienne, un effet protecteur important contre les effets de la surexposition au son était obtenu chez le rat par l'injection conjointe d'une SOD et d'allopurinol (un inhibiteur de la xanthine oxydase) (Seidman *et al.*, 1993). Cette injection protégeait ces animaux des effets produits par l'exposition à un son de large spectre (100 Hz à 20 kHz), d'une intensité de 90 dB pendant 60 heures ; l'élévation du seuil auditif était moindre qu'en l'absence de ce traitement.

Une prévention de la perte auditive peut être obtenue par un préconditionnement sonore. Il s'agit d'une voie intéressante à explorer dans une perspective thérapeutique, car la protection obtenue pourrait s'appliquer à une diversité de situations d'agression du système auditif. Le préconditionnement sonore produit une élévation des protéines « chaperons ». Ces protéines, découvertes lors de la réponse à un choc thermique, sont aussi appelées « protéines du choc thermique », ou *heat shock proteins* (HSP) (May *et al.*, 2013). La protéine HSP70 protège les cellules sensorielles de l'utricule contre les effets délétères des aminoglycosides. Elle est secrétée par les cellules de soutien, et agirait sur les cellules sensorielles. Dans un article récent (Roy *et al.*, 2013), le protocole de préconditionnement sonore utilisé conduisait à une élévation significative d'HSP32 et très forte d'HSP70, qui protégeait l'audition des animaux soumis au cisplatine ou aux aminoglycosides...

La restriction calorique a un effet majeur sur le statut redox. Elle ralentit la progression de la surdité liée à l'âge, ou presbyacousie, chez la souris C57BL/6J (Someya & Prolla, 2010). Elle protège les neurones du ganglion cochléaire et les cellules sensorielles de la cochlée des souris C57BL/6J. Son effet sur le seuil auditif implique la sirtuine 3, située dans la mitochondrie, et dont l'expression augmente en réponse à la diète calorique. Les sirtuines sont des désacétylases dépendantes de NAD^+. Elles contrôlent la transcription, en agissant sur les histones et sur de nombreux facteurs de transcription ; elles agissent également sur des enzymes. Quand le gène qui code pour la sirtuine 3 est inactivé, l'effet de la diète calorique sur la progression de la presbyacousie reste limité. La diète calorique conduit à une baisse du glutathion oxydé, sans modification du glutathion réduit. Chez les souris soumises à la diète calorique mais défectueuses en sirtuine 3, le glutathion oxydé augmente. Durant la diète calorique, la sirtuine 3 semble conduire à un environnement plus réducteur au sein de la mitochondrie, ce qui augmente le système de défense anti-oxydant lié au glutathion. La sirtuine 3 désacétyle l'isocitrate déshydrogénase 2 mitochondriale, et stimule ainsi son activité enzymatique (conversion de $NADP^+$ en NADPH). Or les deux voies mitochondriales anti-oxydantes qui convertissent H_2O_2 en H_2O, celle des Grx et celle du système Prx-Trx, utilisent des réductases à NADPH. Notons que c'est la première fois qu'une explication moléculaire de l'effet bénéfique de la restriction calorique sur la progression de la perte auditive liée à l'âge est avancée.

Références bibliographiques

Al-Mehdi A.B., Pastukh V.M., Swiger B.M., Reed D.J., Patel M.R., Bardwell G.C., Pastukh V.V., Alexeyev M.F., Gillespie M.N. (2012) Perinuclear mitochondrial clustering creates an oxidant-rich nuclear domain required for hypoxia-induced transcription. *Sci Signal* 5, ra47.

Bener Aksam E., Jungwirth H., Kohlwein S.D., Ring J., Madeo F., Veenhuis M., van der Klei I.J. (2008) Absence of the peroxiredoxin Pmp20 causes peroxisomal protein leakage and necrotic cell death. *Free Radic Biol Med* 45, 1115-24.

Bindoli A., Fukuto J.M., Forman H.J. (2008) Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 10, 1549-64.

De Duve C. (1969) Evolution of the peroxisome. *Ann N Y Acad Sci* 168, 369-81.

De Duve C., Baudhuin P. (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* 46, 323-57.

Diano S., Liu Z.W., Jeong J.K., Dietrich M.O., Ruan H.B., Kim E., Suyama S., Kelly K., Gyengesi E., Arbiser J.L., Belsham D.D., Sarruf D.A., Schwartz M.W., Bennett A.M., Shanabrough M., Mobbs C.V., Yang X., Gao X.B., Horvath T.L. (2011) Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nat Med* 17, 1121-7.

Dimitrov L., Lam S.K., Schekman R. (2013) The role of the endoplasmic reticulum in peroxisome biogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a013243.

Dirkx R., Vanhorebeek I., Martens K., Schad A., Grabenbauer M., Fahimi D., Declercq P., Van Veldhoven P.P., Baes M. (2005) Absence of peroxisomes in mouse hepatocytes causes mitochondrial and ER abnormalities. *Hepatology* 41, 868-78.

Finkel T. (2011) Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 194, 7-15.

Gardes-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D. (2003) Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? Reactive oxygen species. How oxygen may become toxic?. *L'Actualité chimique* 11-12, 91-96.

Islinger M., Grille S., Fahimi H.D., Schrader M. (2012) The peroxisome: an update on mysteries. *Histochem Cell Biol* 137, 547-74.

Kassmann C.M. (2014) Myelin peroxisomes – essential organelles for the maintenance of white matter in the nervous system. *Biochimie* 98, 111-8.

Legakis J.E., Koepke J.I., Jedeszko C., Barlaskar F., Terlecky L.J., Edwards H.J., Walton P.A., Terlecky S.R. (2002) Peroxisome senescence in human fibroblasts. *Mol Biol Cell* 13, 4243-55.

Lodhi I.J., Semenkovich C.F. (2014) Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling. *Cell Metab* 19, 380-92.

Ma C., Hagstrom D., Polley S.G., Subramani S. (2013) Redox-regulated cargo binding and release by the peroxisomal targeting signal receptor, Pex5. *J Biol Chem* 288, 27220-31.

Marshall P.A., Dyer J.M., Quick M.E., Goodman J.M. (1996) Redox-sensitive homodimerization of Pex11p: a proposed mechanism to regulate peroxisomal division. *J Cell Biol* 135, 123-37.

May L.A., Kramarenko I.I., Brandon C.S., Voelkel-Johnson C., Roy S., Truong K., Francis S.P., Monzack E.L., Lee F.S., Cunningham L.L. (2013) Inner ear supporting cells protect hair cells by secreting HSP70. *J Clin Invest* 123, 3577-87.

McCulloch V., Seidel-Rogol B.L., Shadel G.S. (2002) A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Mol Cell Biol* 22, 1116-25.

Nagotu S., Kalel V.C., Erdmann R., Platta H.W. (2012) Molecular basis of peroxisomal biogenesis disorders caused by defects in peroxisomal matrix protein import. *Biochim Biophys Acta* 1822, 1326-36.

Ohdate T., Inoue Y. (2012) Involvement of glutathione peroxidase 1 in growth and peroxisome formation in Saccharomyces cerevisiae in oleic acid medium. *Biochim Biophys Acta* 1821, 1295-305.

Petriv O.I., Rachubinski R.A. (2004) Lack of peroxisomal catalase causes a progeric phenotype in Caenorhabditis elegans. *J Biol Chem* 279, 19996-20001.

Prezant R.T., Shohat M., Jaber L., Pressman S., Fischel-Ghodsian N. (1992) Biochemical characterization of a pedigree with mitochondrially inherited deafness. *Am J Med Genet* 44, 465-72.

Raimundo N., Song L., Shutt T.E., McKay S.E., Cotney J., Guan M.X., Gilliland T.C., Hohuan D., Santos-Sacchi J., Shadel G.S. (2012) Mitochondrial stress engages E2F1 apoptotic signaling to cause deafness. *Cell* 148, 716-26.

Ross C.J., Katzov-Eckert H., Dube M.P., Brooks B., Rassekh S.R., Barhdadi A., Feroz-Zada Y., Visscher H., Brown A.M., Rieder M.J., Rogers P.C., Phillips M.S., Carleton B.C., Hayden M.R. (2009) Genetic variants in TPMT and COMT are associated with hearing loss in children receiving cisplatin chemotherapy. *Nat Genet* 41, 1345-9.

Roy S., Ryals M.M., Van den Bruele A.B., Fitzgerald T.S., Cunningham L.L. (2013) Sound preconditioning therapy inhibits ototoxic hearing loss in mice. *J Clin Invest* 123, 4945-9.

Sasabe J., Miyoshi Y., Suzuki M., Mita M., Konno R., Matsuoka M., Hamase K., Aiso S. (2012) D-amino acid oxidase controls motoneuron degeneration through D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 627-32.

Schrader M., Fahimi H.D. (2006) Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1755-66.

Schrader M., Reuber B.E., Morrell J.C., Jimenez-Sanchez G., Obie C., Stroh T.A., Valle D., Schroer T.A., Gould S.J. (1998) Expression of PEX11beta mediates peroxisome proliferation in the absence of extracellular stimuli. *J Biol Chem* 273, 29607-14.

Schrader M., Yoon Y. (2007) Mitochondria and peroxisomes: are the 'big brother' and the 'little sister' closer than assumed? *Bioessays* 29, 1105-14.

Schriner S.E., Linford N.J., Martin G.M., Treuting P., Ogburn C.E., Emond M., Coskun P.E., Ladiges W., Wolf N., Van Remmen H., Wallace D.C., Rabinovitch P.S. (2005) Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308, 1909-11.

Seidman M.D., Shivapuja B.G., Quirk W.S. (1993) The protective effects of allopurinol and superoxide dismutase on noise-induced cochlear damage. *Otolaryngol Head Neck Surg* 109, 1052-6.

Smith J.J., Aitchison J.D. (2013) Peroxisomes take shape. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 803-17.

Someya S., Prolla T.A. (2010) Mitochondrial oxidative damage and apoptosis in age-related hearing loss. *Mech Ageing Dev* 131, 480-6.

Thomas A.J., Hailey D.W., Stawicki T.M., Wu P., Coffin A.B., Rubel E.W., Raible D.W., Simon J.A., Ou H.C. (2013) Functional mechanotransduction is required for cisplatin-induced hair cell death in the zebrafish lateral line. *J Neurosci* 33, 4405-14.

Trompier D., Vejux A., Zarrouk A., Gondcaille C., Geillon F., Nury T., Savary S., Lizard G. (2014) Brain peroxisomes. *Biochimie* 98, 102-10.

Weinshilboum R.M. (2006) Pharmacogenomics: catechol O-methyltransferase to thiopurine S-methyltransferase. *Cell Mol Neurobiol* 26, 539-61.

Weng H., Ji X., Naito Y., Endo K., Ma X., Takahashi R., Shen C., Hirokawa G., Fukushima Y., Iwai N. (2013) Pex11alpha deficiency impairs peroxisome elongation and division and contributes to nonalcoholic fatty liver in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304, E187-96.

Séminaire [b]

6 février 2014 : Prédispositions génétiques aux maladies communes : de la causalité aux facteurs de prédisposition en interaction avec l'environnement. Jean-Louis Mandel, IGBMC, université Louis Pasteur, Strasbourg

6 mars 2014 : Détection hors fréquence et réponses cochléaires fantômes. Paul Avan, laboratoire de biophysique sensorielle, faculté de médecine, université d'Auvergne, Clermont-Ferrand.

13 mars 2014 : Les antibiotiques sont-ils autodestructeurs ? Patrice Courvalin, unité des agents antibactériens, institut Pasteur, Paris.

20 mars 2014 : Acouphènes subjectifs : physiopathologie et éléments d'une prise en charge rationnelle. Alain Londero, service ORL et CCF, hôpital européen G. Pompidou, Paris.

Professeur invité

Albert James Hudspeth, professeur à l'université Rockefeller, New-York, États-Unis : « How hearing happens » (quatre conférences, octobre 2013 [1]).

Activité de recherche du laboratoire

Les avancées les plus significatives réalisées au cours de l'année 2013-2014 ont porté sur :

– l'identification d'un nouveau gène de surdité profonde de transmission récessive, *EPS8*, codant un partenaire de liaison de l'actine présent dans la touffe ciliaire des cellules sensorielles auditives (Behlouli *et al.*, 2014, *Orphanet J. Rare Dis.*) ;

– la caractérisation d'un mode inhabituellement puissant d'interférence entre sons de haute et basse fréquences dans un modèle de souris comportant des anomalies des touffes ciliaires des cellules ciliées externes à la base de la cochlée (Kamiya *et al.*, 2014, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*) ;

– la démonstration que, contrairement à ce qui avait été publié, les 3 isoformes de la protocadhérine-15 ne se compensent l'une l'autre que très transitoirement pour former les liens de bout de cil (*tip links*) qui occupent une place centrale dans la transduction mécano-électrique des cellules ciliées de la cochlée ; l'identification de l'isoforme CD2 comme indispensable à la transduction mécano-électrique auditive (Pepermans *et al.*, 2014, *EMBO Mol. Med.*) ;

– la comparaison des propriétés de l'exocytose synaptique dépendant de l'otoferline dans les cellules ciliées de la cochlée et du vestibule (Vincent *et al.*, 2014, *J. Neurosci.*) ;

– la caractérisation fine du déplacement du kinocil qui préside à la morphogénèse de la touffe ciliaire (antenne sensorielle) des cellules sensorielles auditives, chez la

b. Le séminaire est disponible en audio sur le site internet du Collège de France : http://www.college-de-france.fr/site/christine-petit/seminar-2013-2014.htm.

1. Voir résumé *infra*, p. 981-983. Les conférences sont disponibles en audio sur le site internet du Collège de France : http://www.college-de-france.fr/site/christine-petit/guestlecturer-2013-2014.htm [NdÉ].

souris : démonstration du caractère graduel de cette migration et mise en évidence du mouvement brownien confiné des centrioles dans les cellules ciliées internes (Lepelletier *et al.*, 2013, *Biophys. J.*) ;

– la caractérisation de la spectrine ß5, une isoforme géante de la spectrine, comme partenaire de liaison de plusieurs protéines impliquées dans le syndrome de Usher de type 1 (Papal *et al.*, 2013, *Hum. Mol. Genet.*).

1) *EPS8*, un nouveau gène de surdité profonde de transmission récessive, codant un partenaire de liaison de l'actine présent dans la touffe ciliaire des cellules sensorielles auditives

Behlouli A., Bonnet C., Abdi S., Bouaita A., Lelli A., Hardelin J.-P., Schietroma C., Rous Y., Louha M., Cheknane A., Lebdi H., Boudjelila K., Makrelouf M., Zenati A., Petit C. (2014)

L'analyse par séquençage exomique complet chez deux enfants algériens, nés de parents consanguins et affectés d'une surdité congénitale profonde, nous a permis d'identifier une mutation non-sens du gène *EPS8*, à l'état homozygote. Ce gène code une protéine de 822 acides aminés impliquée dans la dynamique des filaments d'actine et présente dans la touffe ciliaire des cellules sensorielles auditives. Les souris invalidées pour le gène orthologue sont également atteintes de surdité profonde, et les stéréocils de leurs cellules ciliées sont anormalement courts, ce qui suggère que la surdité de ces patients est également due à une anomalie des touffes ciliaires de leurs cellules sensorielles auditives.

2) Caractérisation d'une interférence inhabituellement puissante entre sons de haute fréquence et sons de basse fréquence dans la cochlée d'une souris mutante invalidée pour le gène *Nherf1*

Kamiya K., Michel V., Giraudet F., Riederer B., Foucher I., Papal S., Perfettini I., Le Gal S., Verpy E., Xia W., Seidler U., Georgescu M.M., Avan P., El-Amraoui A., Petit C. (2014)

Un renforcement du masquage par les sons de basse fréquence est une des conséquences perceptives d'une atteinte localisée des cellules sensorielles auditives lorsque l'élévation du seuil de perception auditive dépasse 40 dB. La protéine sous-membranaire Nherf1 est un composant de la touffe ciliaire des cellules ciliées externes pendant leur différenciation. Les souris mutantes dépourvues de cette protéine comportent des anomalies des touffes ciliaires des cellules ciliées externes prédominantes à la base de la cochlée, où sont normalement analysés les sons de haute fréquence (sons aigus). L'élévation de leur seuil de perception de tels sons est cependant modérée (22-35 dB), malgré un dysfonctionnement majeur de ces cellules, attesté par l'absence d'otoémissions correspondant aux produits acoustiques de distorsion, et la diminution très importante du potentiel microphonique cochléaire. De plus, à la différence des souris non-mutantes, les réponses électriques de ces souris à de brefs sons-tests de haute fréquence (20-40 kHz) ne sont pas inhibées par un son prolongé simultané de fréquence voisine, mais le sont par des sons plus graves d'environ deux octaves, même de faible intensité (jusqu'à 25 dB de moins que le son test). De telles caractéristiques du masquage d'un son de haute fréquence par des sons de basse fréquence sont incompatibles avec le modèle explicatif actuel,

et suggèrent donc un mécanisme différent : chez ces souris, les sons de haute fréquence pourraient se propager le long de la membrane tectoriale jusqu'à la région apicale de la cochlée, normalement dévolue à l'analyse des sons de basse fréquence, où ils pourraient alors, dans cette région morphologiquement intacte, interagir très efficacement avec un son simultané de basse fréquence. Cette observation révèle une source possible de mésinterprétation de seuils audiométriques faussement rassurants chez certains patients dont la déficience perceptive serait en réalité bien plus importante en raison d'une hypervulnérabilité à l'effet de masquage des sons de basse fréquence.

3) Caractérisation de l'isoforme CD2 de la protocadhérine-15 comme constituant essentiel des liens de bout de cil (*tip-links*) de la touffe ciliaire des cellules sensorielles auditives

Pepermans E., Michel V., Goodyear R., Bonnet C., Abdi S., Dupont T., Gherbi S., Holder M., Makrelouf M., Hardelin J.-P., Marlin S., Zenati A., Richardson G., Avan P., Bahloul A., Petit C. (2014)

La protocadhérine-15, protéine transmembranaire, est un composant des liens de bout de cil (*tip-links*), filaments inter-stéréociliaires qui occupent une place centrale dans la transduction mécano-électrique des cellules sensorielles de l'oreille interne. Il existe trois isoformes de cette protéine, qui résultent d'un épissage alternatif et ne diffèrent que par leur domaine cytoplasmique : CD1, CD2, CD3. Ces isoformes, pensait-on, agissent de façon redondante dans les touffes ciliaires des cellules sensorielles auditives. Par immunomarquage spécifique de l'isoforme CD2, et par l'analyse morphologique et électrophysiologique de souris mutantes qui perdent cette seule isoforme après la période de différenciation de la touffe ciliaire, nous avons montré que cette isoforme est un composant essentiel des *tip-links* dans les cellules sensorielles auditives matures. Cette conclusion a pu être étendue à l'homme grâce à l'identification, à l'état homozygote, chez quelques individus sourds profonds, d'une mutation tronquante de *PCDH15* qui n'affecte que l'isoforme CD2. Ce résultat est important pour la recherche des autres composants de la machinerie de transduction mécano-électrique des cellules sensorielles et pour le développement de thérapies.

4) Comparaison électrophysiologique des propriétés de l'exocytose synaptique dépendant de l'otoferline dans les cellules ciliées de la cochlée et du vestibule

Vincent P., Bouleau Y., Safieddine S., Petit C., Dulon D. (2014)

Les synapses à rubans des cellules sensorielles du vestibule et de la cochlée diffèrent par leur structure et leurs caractéristiques d'activation. Chaque cellule ciliée vestibulaire de type I est en rapport avec une terminaison nerveuse unique en forme de calice, sur laquelle se fixe le neurotransmetteur libéré par les vésicules synaptiques associées aux multiples rubans de la cellule ciliée, tandis que chaque cellule ciliée interne de la cochlée est en rapport avec les terminaisons de plusieurs fibres nerveuses afférentes (boutons synaptiques), chacune faisant face à un ruban de la cellule ciliée. Les mécanismes moléculaires contrôlant la libération du neurotransmetteur dans ces deux types de synapses à rubans sont encore assez mal

compris. Durant l'activation des canaux calciques présynaptiques par la dépolarisation cellulaire, nous avons trouvé une plus grande sensibilité à la concentration d'ions Ca^{2+}, ainsi qu'une gamme dynamique plus étroite de l'exocytose des vésicules synaptiques dans les cellules vestibulaires de type I que dans les cellules ciliées internes de la cochlée. Les cellules vestibulaires avaient un plus grand nombre de canaux calciques associés à chaque ruban (en moyenne, 158 *versus* 110), mais la densité du courant Ca^{2+} y était deux fois plus faible en raison d'une probabilité d'ouverture de ces canaux et d'une conductance unitaire moindres. Grâce à une analyse en microscopie à haute résolution, nous avons montré que les cellules vestibulaires possèdent moins de rubans que les cellules cochléaires (7 *versus* 17, en moyenne), mais que les canaux calciques Cav1.3 leur sont plus étroitement liés. Des expériences de libération graduelle de Ca^{2+} encagé ont par ailleurs montré une sensibilité intrinsèque au Ca^{2+} similaire dans les deux types de cellules sensorielles. Enfin, chez les souris mutantes dépourvues d'otoferline, l'exocytose synaptique était fortement diminuée dans les deux types de cellules. Nous en avons conclu que ces cellules utilisent toutes deux l'otoferline comme détecteur de la concentration locale d'ions Ca^{2+} (avec une sensibilité de l'ordre du micromolaire), et que leur spécificité de codage sensoriel est principalement déterminée par une organisation fonctionnelle différente des canaux calciques associés à chaque zone active centrée sur un ruban.

5) Analyse fine de la migration du kinocil dans les cellules ciliées cochléaires en cours de différenciation : démonstration du caractère graduel de cette migration et mise en évidence du mouvement brownien confiné des centrioles dans les cellules ciliées internes

Lepelletier L., Boutet de Monvel J., Buisson J., Desdouets C., Petit C. (2013)

La morphogénèse de la touffe ciliaire se produit chez la souris en concomitance avec l'établissement de la polarité planaire du neuroépithélium cochléaire, durant sa période d'extension-convergence. La polarisation de la touffe ciliaire dépend d'un cil primaire spécialisé, le kinocil, qui migre de façon orientée du centre à la périphérie de la surface apicale de la cellule ciliée. Cette migration n'ayant pas été observée directement, on sait très peu de choses sur sa dynamique et sur les forces qui la dirigent. En exploitant le gradient de différentiation des cellules ciliées de la base à l'apex de la cochlée, nous avons d'abord reconstruit, par immunomarquage et segmentation de contours cellulaires, une carte des étapes de la migration du kinocil des cellules ciliées internes (CCI) à un stade donné le long de la cochlée. Par ailleurs, nous avons développé une approche de vidéo-microscopie *ex vivo* permettant de suivre, dans des explants de cochlée de souris en culture, les mouvements des centrioles des CCI rendus fluorescents par l'expression d'une centrine fusionnée à la GFP. Un algorithme permet d'analyser ces mouvements avec une précision de l'ordre de 10 nm. À tous les stades examinés au cours de la migration du kinocil, nous avons trouvé que le centriole mère (ou corps basal) et le centriole fille associé restent confinés à la surface apicale des CCI, chacun effectuant un mouvement brownien couvrant une région de 0,2-0,35 µm de diamètre. L'analyse de ce mouvement indique qu'il est confiné par une force de rappel non-linéaire de l'ordre de 0,1 pN, vraisemblablement imposée aux centrioles par des éléments du cytosquelette. Ces analyses, statique et dynamique, révèlent que la migration du

kinocil est un processus graduel étalé sur ~ 2,5 jours, ayant lieu parallèlement au processus d'alignement des cellules ciliées en rangées ordonnées. L'analyse du mouvement des centrioles des cellules ciliées dans des conditions normales et pathologiques devrait permettre d'éclaircir les structures qui contraignent leur mouvement et celui du kinocil.

6) Caractérisation de la spectrine β5, une isoforme géante de la spectrine, comme partenaire de liaison de plusieurs protéines impliquées dans le syndrome de Usher de type 1, et d'un rôle possible dans le transport de l'opsine vers le segment externe des cellules photoréceptrices

Papal S., Cortese M., Legendre K., Sorusch N., Dragavon J., Sahly I., Shorte S., Wolfrum U., Petit C., El-Amraoui A. (2013)

La spectrine β5 est une isoforme géante de la spectrine β, dont nous avions précédemment révélé la présence dans la paroi latérale des cellules ciliées externes de la cochlée. Nous avons montré que cette spectrine interagit avec trois protéines impliquées dans le syndrome de Usher de type 1, dont la myosine VIIa, une protéine motrice associée au cytosquelette d'actine, ainsi qu'avec différentes protéines de la phototransduction, dont la rhodopsine, et avec certaines protéines motrices associées aux microtubules (kinésine II et complexe dynéine). Compte tenu de la distribution polarisée de la spectrine β5 entre l'appareil de Golgi et la base du segment externe des cellules photoréceptrices, nous avons proposé que cette spectrine, capable de former des homodimères *in vitro*, contribue au transport de l'opsine et d'autres protéines vers les disques du segment externe des photorécepteurs, siège de la phototransduction, en couplant ces protéines aux moteurs moléculaires associés aux microfilaments et aux microtubules.

PUBLICATIONS

2014

BEHLOULI A., BONNET C., ABDI S., BOUAITA A., LELLI A., HARDELIN J.-P., SCHIETROMA C., ROUS Y., LOUHA M., CHEKNANE A., LEBDI H., BOUDJELIDA K., MAKRELOUF M., ZENATI A. et PETIT C., « *EPS8*, encoding an actin-binding protein of cochlear hair cell stereocilia, is a new causal gene for autosomal recessive profound deafness », *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9(55), 2014, DOI : 10.1186/1750-1172-9-55.

EL-AMRAOUI A. et PETIT C., « The retinal phenotype of Usher syndrome: pathophysiological insights from animal models », *C R Biol.*, 337(3), 2014, 167-177, DOI : 10.1016/j.crvi.2013.12.004.

KAMIYA K., MICHEL V., GIRAUDET F., RIEDERER B., FOUCHER I., PAPAL S., PERFETTINI I., LE GAL S., VERPY E., XIA W., SEIDLER U., GEORGESCU M.-M., AVAN P., EL-AMRAOUI A. et PETIT C., « An unusually powerful mode of low-frequency sound interference due to defective hair bundles of the auditory outer hair cells », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(25), 2014, 9307-9312, DOI : 10.1073/pnas.1405322111.

MICHALSKI N. et PETIT C., « Genetics of auditory mechano-electrical transduction », *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 467(1), 25 juin 2014 [Epub].

PEPERMANS E., MICHEL V., GOODYEAR R., BONNET C., ABDI S., DUPONT T., GHERBI S., HOLDER M., MAKRELOUF M., HARDELIN J.-P., MARLIN S., ZENATI A., RICHARDSON G., AVAN P., BAHLOUL A. et PETIT C., « The CD2 isoform of protocadherin-15 is an essential component of the tip-link complex in mature auditory hair cells », *EMBO Molecular Medicine*, 6(7), 2014, 984-992, DOI : 10.15252/emmm.201403976.

RIAHI Z., BONNET C., ZAININE R., LOUHA M., BOUYACOUB Y., LAROUSSI N., CHARGUI M., KEFI R., JONARD L., DORBOZ I., HARDELIN J.-P., SALAH S.B., LEVILLIERS J., WEIL D., MCELREAVEY K., BOESPFLUG O.T., BESBES G., ABDELHAK S. et PETIT C., « Whole exome sequencing identifies new causative mutations in Tunisian families with non-syndromic deafness », *PloS One*, 9(6), 2014, e99797, DOI : 10.1371/journal.pone.0099797.

ROMDHANE L., BEN HALIM N., REJEB I., KEFI R., BOUYACOUB Y., BEN REKAYA M., MESSAI H., MESSAOUD O., RIAHI Z., BONNET C., BEN RHOUMA F., NAGARA M., PETIT C., MCELREAVEY K., ROMEO G. et ABDELHAK S., « Specific aspects of consanguinity: some examples from the Tunisian population », *Human Heredity*, 77(1-4), 2014, 167-174, DOI : 10.1159/000362167.

VINCENT P.F.Y., BOULEAU Y., SAFIEDDINE S., PETIT C. et DULON D., « Exocytotic machineries of vestibular type I and cochlear ribbon synapses display similar intrinsic otoferlin-dependent Ca2+ sensitivity but a different coupling to Ca2+ channels », *The Journal of Neuroscience*, 34(33), 2014, 10853-10869, DOI : 10.1523/JNEUROSCI.0947-14.2014.

WANG H., ZHAO Y., YI Y., GAO Y., LIU Q., WANG D., LI Q., LAN L., LI N., GUAN J., YIN Z., HAN B., ZHAO F., ZONG L., XIONG W., YU L., SONG L., YI X., YANG L., PETIT C. et WANG Q., « Targeted high-throughput sequencing identifies pathogenic mutations in KCNQ4 in two large Chinese families with autosomal dominant hearing loss », *PloS One*, 2014, 9(8), e103133, DOI : 10.1371/journal.pone.0103133.

2013

AVAN P., BÜKI B. et PETIT C., « Auditory distortions: origins and functions », *Physiological Reviews*, 93(4), 2013, 1563-1619, DOI : 10.1152/physrev.00029.2012.

BONNET C., LOUHA M., LOUNDON N., MICHALSKI N., VERPY E., SMAGGHE L., HARDELIN J.-P., ROUILLON I., JONARD L., COUDERC R., GHERBI S., GARABEDIAN E.N., DENOYELLE F., PETIT C. et MARLIN S., « Biallelic nonsense mutations in the otogelin-like gene (*OTOGL*) in a child affected by mild to moderate hearing impairment », *Gene*, 527(2), 2013, 537-540, DOI : 10.1016/j.gene.2013.06.044.

BOULAY A.-C., DEL CASTILLO F.J., GIRAUDET F., HAMARD G., GIAUME C., PETIT C., AVAN P. et COHEN-SALMON M., « Hearing is normal without connexin30 », *The Journal of Neuroscience*, 33(2), 2013, 430-434, DOI : 10.1523/JNEUROSCI.4240-12.2013.

EL-AMRAOUI A. et PETIT C., « Cadherin defects in inherited human diseases », *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 116, 2013, 361-384, DOI : 10.1016/B978-0-12-394311-8.00016-9.

LEPELLETIER L., BOUTET DE MONVEL J., BUISSON J., DESDOUETS C. et PETIT C., « Auditory hair cell centrioles undergo confined Brownian motion throughout the developmental migration of the kinocilium », *Biophysical Journal*, 105(1), 2013, 48-58, DOI : 10.1016/j.bpj.2013.05.009.

MEYER A., PETIT C. et SAFIEDDINE S., « [Gene therapy for human hearing loss: challenges and promises] », *Médecine Sciences: M/S*, 29(10), 2013, 883-889, DOI : 10.1051/medsci/20132910016.

PAPAL S., CORTESE M., LEGENDRE K., SORUSCH N., DRAGAVON J., SAHLY I., SHORTE S., WOLFRUM U., PETIT C. et EL-AMRAOUI A., « The giant spectrin βV couples the molecular motors to phototransduction and Usher syndrome type I proteins along their trafficking route », *Human Molecular Genetics*, 22(18), 2013, 3773-3788, DOI : 10.1093/hmg/ddt228.

ZHAO Y., ZHAO F., ZONG L., ZHANG P., GUAN L., ZHANG J., WANG D., WANG J., CHAI W., LAN L., LI Q., HAN B., YANG L., JIN X., YANG W., HU X., WANG X., LI N., LI Y., PETIT C., WANG J., WANG H.Y.J. et WANG Q., « Exome sequencing and linkage analysis identified *tenascin-C (TNC)* as a novel causative gene in nonsyndromic hearing loss », *PloS One*, 8(7), 2013, e69549, DOI : 10.1371/journal.pone.0069549.

CONFÉRENCES ET RESPONSABILITÉS

Séminaires et conférences sur invitation

Meeting Clinical utility of molecular genetic testing in ENT/audiology in DK, Copenhague, Danemark, 19 nov. 2013 : « The outcome of two decades of research on human hereditary deafness: the improvements achieved in the clinical management of deaf individuals and the challenges ahead ».

Congrès ANOL ORL, Alger, Algérie, 27 février 2014 : « Surdité : la part des gènes ».

ESHG European Human Genetics Conference, Milan, Italie, 2 juin 2014 : symposium « Networks and pathways in genetic diseases » - *Perspective on the biological networks of genes and proteins involved in hearing and genetic deafness* : « Signaling networks in the auditory sensory cells unveiled by hereditary deafness ».

Laboratoire de physique théorique, faculté des sciences, Orsay, 17 juin 2014 : « Traitement du son dans l'organe sensoriel auditif : l'éclairage apporté par les surdités héréditaires ».

International Symposium on Usher syndrome, Boston, États-Unis, 10 juillet 2014 : « Usher syndromes: gathering basic knowledge towards the development of therapeutic approaches » (*keynote*).

Lecture Series, Généthon, Évry, France, 12 septembre 2014 : « Hearing impairment: from genes to therapies ».

VIB in Biosciences, Anvers, Belgique, 18 sept. 2014 : « Understanding hereditary hearing disorders ».

Symposium *Consanguinity and hereditary rare diseases: challenges and perspectives in post-genomics*, Institut Pasteur, Tunis, Tunisie, 23 sept. 2014 : « Research on hereditary hearing impairment: past, present and future ».

IFSCC Congress Cosmetology, Paris, France, 27 oct. 2014 : « Senses and sensitivity: let's welcome the skin on board » (*keynote*).

IEB Inner Ear Biology Congress, Kyoto, Japon, 1er nov. 2014 : « Genetic and biochemical approaches of the mechano-electrical transduction machinery ».

Conférences grand public

La main à la pâte, HandiSCitoyen, ENS, Paris, 23 nov. 2013 : « Apports et perspectives scientifiques sur le handicap sensoriel: l'exemple de la malentendance ».

Colloque 50 ans de l'Inserm, Sorbonne, Paris, 3 avril 2014 : « Entendrez-vous ? »

Congrès ARDDS (Association de réadaptation et défense des devenus-sourds), Paris, 29 april 2014 : « Où en est la recherche sur les surdités génétiques ? »

UTLS Assoscience Toulouse, 14 mai 2014 : « Des gènes responsables de surdité aux mécanismes de traitement des signaux acoustiques ».

Forum « Ensemble pour mieux entendre », Bucodes Surdifrance, ARDDS IIe de France, AIFIC, Paris, 27 sept. 2014 : « Surdités : causes, mécanismes et nouvelles approches thérapeutiques ».

Programme européen

FP7 EEC « TREATRUSH: *Fighting blindness of Usher syndrome: diagnosis, pathogenesis and retinal treatment* » (2010-2014) : coordinatrice scientifique (10 laboratoires : France, Allemagne, Grande-Bretagne, Italie, Pays-Bas, Suisse, États-Unis).

Direction de thèse

Élise Pepermans (25 sept. 2014), université Paris 6 Pierre & Marie Curie : « La machinerie de la transduction mécano-électrique auditive: composants et interactions » (*The auditory mechano-electrical transduction machinery: components and interactions*).