



HAL
open science

Les nouvelles stratégies thérapeutiques du traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye.

Loubna Abaamrane

► **To cite this version:**

Loubna Abaamrane. Les nouvelles stratégies thérapeutiques du traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. NNT: . tel-00509186

HAL Id: tel-00509186

<https://theses.hal.science/tel-00509186>

Submitted on 10 Aug 2010

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE

Ecole doctorale ingénierie pour la santé, la cognition et l'environnement

DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité : Modèles, méthodes et algorithmes en biologie, santé et environnement

Soutenue publiquement le 18 juin 2010

par

Loubna ABAAMRANE

**Les nouvelles stratégies thérapeutiques du traumatisme
sonore par bruit d'arme chez le cobaye.**

Thèse dirigée par le Dr. Isabelle SENDOWSKI et co-dirigée par le Pr.
Sébastien SCHMERBER

JURY :

Monsieur Jacques VIRET - Président de Jury
Monsieur Paul AVAN - Rapporteur
Monsieur Yves CAZALS - Rapporteur
Monsieur Sébastien SCHMERBER – Codirecteur de thèse

A mes parents,

*A mon grand-père tant aimé qui serait très fier de sa petite-fille
aujourd'hui,*

*« Tu me dis, j'oublie.
Tu m'enseignes, je me souviens.
Tu m'impliques, j'apprends ».*

Benjamin Franklin (1706-1790)

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire de thèse ont été réalisés au sein de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) sous la direction du Docteur Isabelle Sendowski et la codirection du Professeur Sébastien Schmerber.

J'adresse tout d'abord mes remerciements au Docteur Isabelle Sendowski sans qui ce projet de thèse ne serait jamais né. Merci à vous Isabelle pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et pour m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet. Je vous remercie également pour votre contribution à la fois technique et théorique et pour votre très grande disponibilité et votre grande patience tout au long de ce travail. Je n'oublie pas également votre soutien inconditionnel, votre gentillesse et vos précieux conseils. J'ai beaucoup apprécié travailler avec vous et j'en garderai un très bon souvenir.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury :

Monsieur le Médecin Général Jacques Viret, pour me faire l'honneur de présider ce jury.

Messieurs les Professeurs Yves Cazals et Paul Avan, pour avoir accepté de juger ce travail et par ce fait de m'avoir accordé une partie de leur temps.

Monsieur le Professeur Sébastien Schmerber, pour avoir accepté de codiriger cette thèse et pour ses conseils.

Je remercie le Service de Santé des Armées et la Direction Générale de l'Armement (DGA) pour avoir financé ces travaux (contrat n° 05.CO.001-05).

Je remercie Florent Raffin pour son aide technique, ses conseils scientifiques, son soutien et sa gentillesse. Travailler avec toi aura été un plaisir. Merci pour m'avoir permise de travailler dans des conditions agréables.

Je remercie Xavier Holy et Xavier Butigieg pour avoir pris de leur temps pour nous fournir de jolies images de microscopie électronique à balayage. Un grand merci pour ce travail minutieux qui a nécessité une grande patience.

J'adresse également mes remerciements à Edgar Gentilhomme pour sa contribution précieuse en microscopie électronique ainsi que pour ses bons conseils.

Un grand merci à l'ensemble du personnel du département de Radiobiologie et Radiopathologie et du département des Facteurs Humains pour m'avoir accueillie et pour leur soutien, leur aide, leurs encouragements, leurs conseils. Merci à tous.

Je remercie également toute l'équipe de l'animalerie centrale et en particulier Hervé Chaussard pour avoir bien pris soin de nos animaux. Merci pour votre bonne humeur même dans les difficultés, votre aide, vos conseils. Merci pour les bons moments passés avec vous.

Je remercie chaleureusement Céline Crétallaz et Fabien Forcheron pour leur participation à l'aboutissement du manuscrit. Merci à toi Fabien pour tes précieux conseils à la fois pédagogiques et scientifiques mais surtout pour ton aide sur la langue de Shakespeare. Merci à toi Céline pour ton aide « orthographique » et pour ton soutien moral.

Un grand merci à l'ensemble des doctorants et docteurs qui m'ont accompagnée et soutenue tout au long de ce travail : Richard, Virginie, Eugénie, Philippe, Charlotte, Aurore, Céline, Chloé et Sébastien. Merci à vous tous pour les bons moments passés ensemble et votre patience dans mes moments de doute.

Un merci particulier à Renaud Maury pour sa disponibilité, son soutien, son écoute et ses conseils. Sois certain de la grande amitié que je te porte.

Enfin, je remercie mes parents sans qui je n'aurais pas pu aller au bout de mes projets. Merci pour votre amour, votre patience et vos encouragements. Merci également à toute ma famille qui m'a toujours soutenue dans toutes mes décisions.

Liste des publications et communications

Publications :

Sendowski I., **Abaamrane L.**, Raffin F., Clarençon D. (2006) Therapeutic efficacy of intra-cochlear administration of methylprednisolone after acoustic trauma caused by gunshot noise in guinea pigs. *Hear. Res.* 221: 119-127.

Naz P., Holy X., Butigieg X., **Abaamrane L.**, Raffin F., Sendowski I. (2009) Les armes acoustiques: principes, effets et tolérances physiologiques. *Médecines et armées.* 37 : 181-186.

Abaamrane L., Raffin F., Gal M., Avan P., Sendowski I. (2009) Long-term administration of magnesium after acoustic trauma caused by gunshot noise in guinea pigs. *Hearing Res.* 247: 137-145.

Abaamrane L., Holy X., Gentilhomme E., Raffin F., Butigieg X., Schmerber S., Sendowski I. (2010) Gunshot or continuous noise-induced hair cells death in guinea pigs cochlea: cells morphology and kinetic evolution. En préparation.

Abaamrane L., Raffin F., Schmerber S., Sendowski I. (2010) Intracochlear perfusion of leupeptin and z-VAD-FMK: influence of antiapoptotic agents on gunshot-induced hearing loss. Soumis à *Hearing Research*.

Communications orales et affichées:

Raffin F, **Abaamrane L.**, Sendowski I. (2006) Évaluation de deux traitements anti-oxydants après traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye. XXXème journée militaire d'ORL et de chirurgie cervico-faciale. 19 mai 2006. Val-de-Grâce. Paris

Sendowski I, Raffin F, **Abaamrane L.** (2006) Efficacité thérapeutique de l'administration intra-cochléaire de méthylprednisolone après traumatisme sonore chez le cobaye. 113ème congrès de la Société Française d'ORL.; Palais des congrès, 9-11 oct 2006 – PARIS.

Sendowski I., Raffin F., **Abaamrane L.** (2006) Therapeutic efficacy of Magnesium after acoustic trauma caused by gunshot noise in guinea pigs. 11th int. Magnesium symposium. 21-26 oct 2006 – Osaka, Japon.

Abaamrane L., Holy X, Raffin F, Sendowski I. (2007) Traumatisme sonore par bruit d'arme: mort cellulaire et perspectives thérapeutiques. XXXIème journée militaire d'ORL et de chirurgie cervico-faciale. 04 mai 2007. Val-de-Grâce. Paris.

VEC Sendowski, TPC Raffin, **VSSA Abaamrane**, X Holy, PCC Ramirez, MP Gal. (2008) Efficacité de l'administration à long terme du magnésium après traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye. XXXIIème journée militaire d'ORL et de chirurgie cervico-faciale. 16 mai 2008. Val-de-Grâce. Paris.

Abaamrane L., Raffin F, Gal M, Holy X, Sendowski I. (2008) Long term administration of magnesium after acoustic trauma caused by gunshot noise in guinea pigs. European magnesium meeting; Paris 15-17 mai 2008.

Abaamrane L, Holy X, Gentilhomme E, Raffin F, Butigieg X, Schmerber S, Sendowski I. (2008) Gunshot noise-induced hair cells death in guinea pig cochlea: cells, morphology and kinetic evolution. XXIXth International congress of audiology. Hong kong 8-12 juin 2008.

Abaamrane L, Raffin F, Schmerber S, Isabelle S. (2009) Evaluation thérapeutique de l'administration intra-cochléaire d'anti-apoptotiques après traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye: leupeptine et z-VAD-FMK. XXXIIIème Journée militaire d'ORL et de chirurgie cervico-faciale. 05 juin 2009 ; Val-de-Grâce. Paris.

Raffin F, **Abaamrane L**, Sendowski I. (2009) Administration de magnésium à long terme après un traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye. 116ème Congrès de la Société Française d'Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie de la Face et du Cou. 04, 05 et 06 octobre 2009 ; Palais des Congrès, Paris. PRIX DU POSTER 2009 EN OTOLOGIE.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	5
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	9
TABLE DES MATIERES.....	13
LISTE DES FIGURES.....	19
LISTE DES TABLEAUX.....	23
LISTE DES PHOTOS.....	27
ABREVIATIONS.....	31
INTRODUCTION GENERALE.....	35
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	41
CHAPITRE 1 : LE SYSTEME AUDITIF.....	43
1. L'oreille externe.....	44
2. L'oreille moyenne.....	45
3. L'oreille interne.....	47
3.1 La cochlée : anatomie et histologie.....	48
3.1.1 La lame spirale osseuse.....	49
3.1.2 Le mur latéral.....	50
3.1.3 Le ganglion spiral.....	51
3.1.4 L'organe de Corti.....	51
3.1.4.1 La membrane tectoriale.....	51
3.1.4.2 La membrane de Reissner.....	52
3.1.4.3 La membrane basilaire.....	52
3.1.4.4 Les cellules ciliées.....	53
3.1.4.5 Les cellules de soutien.....	55
3.1.5 Les liquides de l'oreille interne.....	56
4. Physiologie auditive.....	56
CHAPITRE 2 : TRAUMATISME SONORE.....	63
1. Conséquences mécaniques d'une surexposition au bruit.....	66
2. Conséquences métaboliques d'une surexposition au bruit.....	66
2.1 Mécanismes ioniques.....	67
2.2 Ischémie/hypoxie.....	68
2.3 Excitotoxicité glutamatergique.....	69
2.4 Radicaux libres et stress oxydants.....	70
2.5 La mort cellulaire programmée ou apoptose.....	72
CHAPITRE 3 : STRATEGIES THERAPEUTIQUES DU TRAUMATISME SONORE.....	83
1. Efficacité des anti-inflammatoires, intérêt des corticoïdes.....	84
2. Efficacité des anti-oxydants.....	91
3. Efficacité des vasodilatateurs.....	97
4. Efficacité des facteurs de croissance.....	98
5. Efficacité du magnésium.....	99
6. Une nouvelle stratégie : efficacité des anti-apoptotiques par voie locale.....	101
7. Autres stratégies thérapeutiques innovantes : thérapie génique et thérapie	

cellulaire	105
8. Cible d'action des substances thérapeutiques du traumatisme sonore : synopsis..	106
TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	109
INTRODUCTION.....	111
1^{ère} partie : efficacité de l'administration intra-cochléaire de méthylprednisolone après traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye.....	113
1. Introduction.....	113
2. Objectif de l'étude.....	115
3. Protocole général.....	115
4. Résultats.....	117
4.1. Résultats préliminaires.....	117
4.2. Pertes auditives après exposition au bruit.....	118
4.3. Pertes cellulaires.....	118
5. Conclusion.....	119
PUBLICATION 1.....	121
2^{ème} partie : efficacité de l'administration à long terme de magnésium après traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye.....	123
1. Introduction.....	123
2. Objectif de l'étude.....	124
3. Protocole général.....	124
4. Résultats.....	126
4.1. Evolution des pertes auditives.....	126
4.2. Produits de distorsion.....	127
4.3. Pertes cellulaires.....	127
5. Conclusion.....	129
PUBLICATION 2.....	131
3^{ème} partie : efficacité des anti-apoptotiques par voie locale chez le cobaye.....	133
<i>A. Etude préliminaire : cinétique comparative de l'apoptose après traumatisme par bruit continu versus bruit d'arme.....</i>	<i>133</i>
1. Introduction.....	134
2. Objectif de l'étude.....	134
3. Protocole général.....	136
4. Résultats.....	136
4.1. Etude préliminaire : évaluation des lésions des deux types de traumatisme.....	136
4.2. Quantification des cellules ciliées apoptotiques.....	137
4.3. Morphologie des cellules ciliées.....	138
4.4. Conclusions et perspectives.....	139
<i>B. Efficacité de l'administration intra-cochléaire de deux molécules anti-apoptotiques : leupeptine et z-VAD-FMK.....</i>	<i>139</i>
1. Introduction.....	139
2. Objectif de l'étude.....	140
3. Protocole général.....	140

4. Résultats.....	142
4.1. Etudes préliminaires.....	142
4.2. Pertes auditives.....	143
4.3. Pertes cellulaires.....	144
5. Conclusion.....	144
PUBLICATION 3.....	147
PUBLICATION 4.....	181
DISCUSSION GENERALE.....	213
1. Modèle de traumatisme sonore par bruit d'arme	215
2. Intérêt de la voie d'administration intra-cochléaire et applications possibles en clinique.....	216
3. Dilemme : fonctionnalité et survie des cellules auditives.....	217
4. Une administration à plus long terme : un meilleur résultat.....	217
5. Bruit d'arme/ Bruit continu.....	218
6. Un résultat fondamental : la voie de mort cellulaire activée après un traumatisme sonore par bruit d'arme.....	219
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	221
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	227
ANNEXES.....	263
ANNEXE 1 : Méthodologie générale.....	265
1. Traumatisme sonore.....	266
2. Réalisation de l'électrocochléographie.....	267
3. Analyse histologique de la cochlée.....	268
ANNEXE 2 : Matériel et méthodes de la 1^{ère} partie.....	271
1. Etude préliminaire.....	271
2. Technique d'administration en continu.....	271
3. Procédures chirurgicales.....	273
4. Suivi auditif et traitement.....	273
5. Analyse statistique.....	274
ANNEXE 3 : Matériel et méthodes de la 2^{ème} partie.....	275
1. Mesure des pertes auditives.....	275
2. Etude des produits de distorsion.....	276
3. Analyse histologique de la cochlée.....	279
4. Analyse statistique.....	279
ANNEXE 4 : Matériel et méthodes de la 3^{ème} partie (A).....	280
1. Traumatisme sonore.....	280
2. Etude préliminaire: évolution des pertes auditives et des pertes cellulaires totales....	280
3. Marquage de l'apoptose des cellules ciliées par la technique TUNEL.....	282
4. Quantification des cellules apoptotiques.....	283
5. Morphologie des cellules ciliées.....	283
5.1. Microscopie électronique à transmission.....	283
5.2. Microscopie électronique à balayage.....	283
ANNEXE 5 : Matériel et méthodes de la 3^{ème} partie (B).....	285
1. Etude préliminaire : substances thérapeutiques testées.....	285
2. Administration des substances.....	285
3. Traumatisme sonore et procédure chirurgicale.....	286

4. Mesure des seuils auditifs.....	286
5. Analyse histologique de la cochlée.....	287
6. Méthode statistique.....	287

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de l'oreille.....	43
Figure 2 : Représentation schématique de la chaîne des osselets de l'oreille moyenne.....	46
Figure 3 : Représentation schématique des labyrinthes osseux et membraneux constituant l'oreille interne. (3a) Labyrinthe osseux : la fenêtre du vestibule est la fenêtre ovale ; la fenêtre cochléaire est la fenêtre ronde. (3b) labyrinthe membraneux.....	48
Figure 4 : Représentation schématique d'une coupe transversale de la cochlée.....	49
Figure 5 : Représentation schématique d'une coupe transversale de l'organe de Corti.....	53
Figure 6 : Morphologie comparée des cellules ciliées de l'organe de Corti.....	55
Figure 7 : Représentation schématique de la tonotopie cochléaire.....	57
Figure 8 : Représentation schématique du champ auditif de l'homme.....	58
Figure 9 : A : Représentation schématique de la transduction mécano-électrique au niveau de la cellule ciliée interne. B : Représentation schématique de la neurotransmission au niveau de la terminaison nerveuse afférente.....	59
Figure 10 : A : Représentation schématique des voies auditives de la cochlée au cortex auditif. B : Représentation schématique de l'innervation de la cellule ciliée interne. C : Représentation schématique de l'innervation de la cellule ciliée externe.....	62
Figure 11 : Différences morphologiques entre cellule apoptotique et cellule nécrotique.....	76
Figure 12 : Principales voies conduisant à l'apoptose.....	78
Figure 13 : Voie de réticulum endoplasmique.....	81
Figure 14 : Deux techniques d'administration locale chez l'homme.....	91
Figure 15 : Schéma synoptique de la physiopathologie du traumatisme sonore et des cibles d'action des substances thérapeutiques.....	108
Figure 16 : Chronologie expérimentale.....	117
Figure 17 : Chronologie expérimentale.....	126
Figure 18 : Chronologie expérimentale.....	136
Figure 19 : Chronologie expérimentale.....	142
Figure 20 : Onde sonore (kPa) et spectre fréquentiel (kHz) pour un bruit de FAMAS de 170 dB SPL (pic).....	267
Figure 21 : Réalisation d'un cochléogramme.....	270
Figure 22 : Instrumentation chirurgicale des animaux.....	272
Figure 23 : Produits de distorsion acoustiques (PDA).....	277

Liste des tableaux

<u>TABLEAU 1</u> : Répartition des surdités.....	65
<u>TABLEAU 2</u> : Tableau comparatif entre apoptose et nécrose.....	76
<u>TABLEAU 3</u> : Quatre études montrant l'efficacité des corticoïdes après traumatisme sonore.....	86
<u>TABLEAU 4</u> : Les systèmes anti-oxydants.....	92
<u>TABLEAU 5</u> : Efficacité d'agents anti-oxydants exogènes après un traumatisme sonore.....	95

Liste des photos

<u>PHOTO 1</u> : Traumatisme sonore par bruit d'arme.....	266
<u>PHOTO 2</u> : Microdissection cochléaire.....	269
<u>PHOTO 3</u> : Mesure des produits de distorsion chez l'animal anesthésié.....	278
<u>PHOTO 4</u> : Traumatisme sonore par bruit continu.....	281

Abréviations

ABR, Auditory Brain Responses ;
BDNF, Brain-Derived Neurotrophic Factor;
CAT, Catalase ;
CCE, Cellule Ciliée Externe ;
CCI, Cellule Ciliée Interne ;
dB SPL, decibel sound pressure level ;
DEX, Dexaméthasone ;
DGA, Direction Générale de l'Armement ;
EPS, Elévation Permanente des Seuils ;
ESM, Erreur Standard de la Moyenne ;
ETS, Elévation Temporaire des Seuils ;
Gpx, Glutathion Peroxydase ;
GR, Glucocorticoid Receptor ;
GSH, Gluthation ;
IP, iodure de propidium ;
IV, Intra-veineuse ;
MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase ;
MDA, Malondialdehyde ;
MP, Méthylprednisolone ;
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells ;
NF- κ B, Nuclear Factor-KappaB ;
NMDA, N-methyl-D-aspartate ;
NOS, Nitric Oxide Synthetase ;
NT-3, Neurotrophin-3 ;
PA, Périlymphe Artificielle ;
PAC, Potentiel d'Action Composite ;
PBS, Phosphate Buffer Saline ;
PDA, Produits de Distorsion Acoustique ;
PEA, Potentiels Evoqués Auditifs ;
PFA, paraformaldéhyde ;
SOD, superoxyde dismutase ;
TUNEL, Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling ;
Z-VAD-FMK, Z-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone;

Introduction générale

Selon les estimations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour 2005, 278 millions de personnes dans le monde souffrent d'une perte auditive modérée ou profonde bilatérale. Le traumatisme sonore est l'une des causes majeures des troubles de l'audition dans les pays industrialisés et un problème coûteux au sein du monde du travail. En France, un actif sur quatre est exposé à des niveaux sonores supérieurs à 85 dB, soit environ 3 millions de salariés. Aux Etats-Unis, dix millions de personnes sont concernés par des lésions auditives consécutives au bruit (Kopke et coll., 2007). Dans le monde, 16 % des pertes auditives chez l'adulte sont dues aux nuisances sonores en milieu professionnel (Nelson et coll., 2005). Chez les jeunes de moins de 25 ans, l'exposition au bruit semble être la cause majeure de déficits auditifs. Les expositions les plus délétères en termes de santé publique sont les concerts en salle ou en plein air, les discothèques, les baladeurs. L'OMS recommande au public des discothèques et des concerts de ne pas rester exposé à des niveaux sonores moyens supérieurs à 100 décibels pendant plus de quatre heures, plus de quatre fois par an. Le bruit traumatisant est souvent de type continu (concert par exemple), de type impulsionnel répétitif (marteau piqueur, bruits industriels) ou impulsionnel pur (explosions, bruit d'arme). Cette dernière situation affecte tout particulièrement les chasseurs, les victimes d'attentats et surtout le personnel militaire. Ainsi, 68 % des blessés américains évacués d'Iraq présentaient des lésions par blast. Parmi eux, 64 % présentaient des lésions auditives sévères (Helfer et coll., 2005 ; Sienda, 2004). En France, le traumatisme sonore aigu est un problème majeur du Service de Santé des Armées en temps de paix. Avec près de 1000 nouveaux cas par an malgré la professionnalisation, le coût thérapeutique, social (indemnisations) et opérationnel qu'il représente est particulièrement élevé. Malgré la sensibilisation croissante sur l'intérêt du port de protections auditives lors des exercices en milieu bruyant, on observe depuis quelques années une augmentation significative des déclarations pour traumatisme sonore

aigu. (Source: *bulletin de rétro-information de la surveillance épidémiologique des unités du secteur sud métropole n° 441/IMMTSSA/DESP du 4 juin 2004*). Dans la majorité des cas (96%), le traumatisme sonore résulte de l'usage d'une arme à feu (Labarère et coll., 2000). Si le port de protections limite très largement son incidence, il n'empêche pas totalement sa survenue (protections mal placées, oreilles fragilisées, oubli.). L'incidence des traumatismes sonores aigus pourrait être largement augmentée en cas de conflit. Ainsi, l'étude de Helfer et al. (2005) portant sur des soldats américains déployés en Iraq montre que le taux de traumatismes acoustiques est 50 fois supérieur à celui observé dans une population militaire hors conflit.

En France, le traumatisme sonore aigu est suivi d'une conduite thérapeutique lourde : hospitalisation et traitement variables selon les écoles. L'administration d'anti-inflammatoires stéroïdiens (methylprednisolone, 1-2 mg/kg, IV durant 5 jours) est à la base de tout traitement. Elle est associée parfois à un vasodilatateur, une oxygénothérapie hyperbare, ou une hémodilution normovolémique. Les données expérimentales mettant en évidence l'efficacité de ces traitements sont rares et portent souvent sur un modèle de traumatisme sonore par bruit continu. Or, les mécanismes lésionnels diffèrent selon le type de bruit et peuvent avoir une double origine: mécanique et/ou métabolique. La part respective jouée par les différents mécanismes pour chaque type de bruit traumatisant n'est pas connue (Hamernik et coll., 1984). Si l'aspect mécanique pourrait prédominer lors de bruits impulsionnels, l'aggravation post-traumatique observée par certains auteurs (Luz 1970, 1971, Hamernik et coll. 1988), pourrait être en faveur d'une implication métabolique secondaire.

L'objectif général de ce travail de thèse est de mettre en place et tester sur un modèle animal de nouvelles stratégies thérapeutiques du traumatisme sonore par bruit d'arme. Un des enjeux des nouvelles approches thérapeutiques du traumatisme sonore est de limiter les

effets secondaires indésirables de la voie d'administration générale. Durant la dernière décennie, les chercheurs ont mis au point des stratégies d'administration par voie locale. Dans ce travail de recherche, la voie d'administration intra-cochléaire associée à une micro-pompe osmotique a été testée d'une part avec le traitement de référence (méthylprednisolone) et d'autre part avec deux anti-apoptotiques (la leupeptine, un inhibiteur des calpaïnes et le z-VAD-FMK, un inhibiteur des caspases) chez le cobaye après un traumatisme sonore par bruit d'arme. Il est actuellement admis que la mort par apoptose des cellules sensorielles de l'audition fait partie des conséquences métaboliques secondaires d'un traumatisme sonore (Yang et coll., 2004 ; Hu et coll., 2006). Un des objectifs de ce travail de thèse a été de détecter et quantifier ce phénomène d'apoptose des cellules sensorielles consécutif aux deux types d'exposition sonore : bruit d'arme et bruit continu. La mesure de l'efficacité des anti-apoptotiques nous permet d'évaluer l'implication des voies de l'apoptose après une exposition à un bruit d'arme. Ces traitements sont délivrés précocement après le traumatisme et sur une durée courte (une semaine). Dans une précédente étude réalisée chez le cobaye traumatisé par un bruit d'arme, nous avons montré l'efficacité du magnésium lorsqu'il est administré par voie générale pendant 7 jours (Sendowski et coll., 2006b). Cependant, après 14 jours de récupération, il existe des différences entre les deux lots mais la significativité a tendance à disparaître. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un prolongement de l'administration du traitement pourrait améliorer son efficacité. Cette hypothèse a fait l'objet d'une autre étude.

Les résultats des différentes études ont permis la rédaction de quatre publications scientifiques soumises et/ou publiées.

Publication 1. Sendowski I., Abaamrane L., Raffin F., Cros A., Clarençon D. (2006) Therapeutic efficacy of intra-cochlear administration of methylprednisolone after acoustic trauma caused by gunshot noise in guinea pigs. *Hearing Res.* 221: 119-127.

Publication 2. Abaamrane L., Raffin F., Gal M., Avan P., Sendowski I. (2009) Long-term administration of magnesium after acoustic trauma caused by gunshot noise in guinea pigs. *Hearing Res.* 247: 137-145.

Publication 3. Abaamrane L., Holy X., Gentilhomme E., Raffin F., Butigieg X., Schmerber S., Sendowski I. Gunshot or continuous noise-induced hair cells death in guinea pig cochlea : cells morphology and kinetic evolution. En préparation.

Publication 4. Abaamrane L., Raffin F., Schmerber S., Sendowski I. Intracochlear perfusion of leupeptin and z-VAD-FMK: influence of antiapoptotic agents on gunshot-induced hearing loss. Soumis 2010.

Rappels bibliographiques

CHAPITRE 1 : LE SYSTEME AUDITIF

Avec la vision, le toucher, l'odorat et le goût, l'audition complète les 5 sens permettant à l'être humain d'interagir avec son environnement et ses congénères. L'audition est le résultat de mécanismes complexes assurés par les deux oreilles permettant la perception binaurale ou stéréophonie. L'appareil auditif se compose de quatre parties : l'oreille externe, l'oreille moyenne, l'oreille interne et, au niveau cérébral, les voies centrales auditives (cortex auditif, colliculus inférieur et noyaux cochléaires). L'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne constituent le système auditif périphérique qui permet la transformation des vibrations sonores en un signal bioélectrique, interprétable par le système nerveux central.

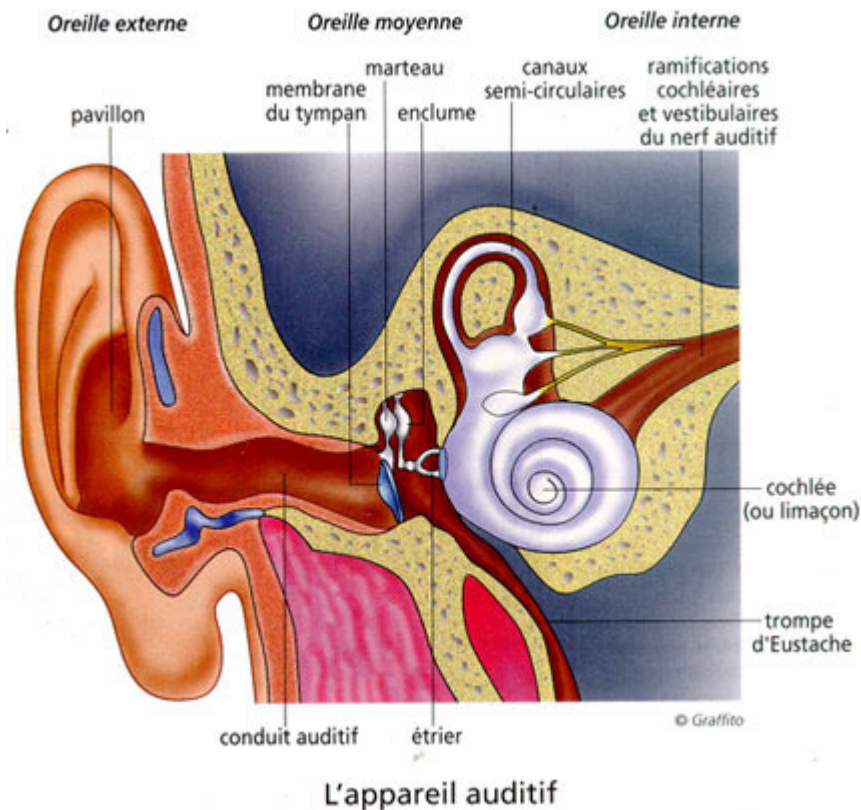


Figure 1 : Représentation schématique de l'oreille (d'après <http://www.cdnf.fr>).

1. L'oreille externe

L'oreille externe constitue le point de départ de la physiologie auditive à savoir la perception du son. Elle se compose du pavillon et du conduit auditif externe qui se termine par le tympan. Le pavillon, en forme de coquille, est la partie visible de l'oreille chez l'Homme. Il s'agit d'une lame fibrocartilagineuse faisant un angle de 30° avec la tête. Cette lame fibrocartilagineuse est recouverte de peau présentant de nombreux replis qui permettent de capter les sons, de les diriger et de situer leur provenance. La partie centrale du pavillon, la conque, se prolonge par le conduit auditif externe. Celui-ci, creusé dans l'os temporal, est un petit tube creux de 2 à 4 cm de long et de 0,5 à 1 cm de diamètre. La peau qui le tapisse contient de très nombreuses glandes sécrétant le cérumen et est recouverte de poils, cette structure permettant de retenir les poussières qui pourraient pénétrer dans le conduit.

Le rôle de l'oreille externe est loin d'être minime. Nous pouvons distinguer deux rôles, à savoir une protection et une amplification. Par ses nombreux replis, le pavillon permet de capter et concentrer les ondes sonores, de les diriger ainsi que de situer leur provenance, ceci en amortissant la brutalité du passage de l'air libre à l'air enclos du conduit auditif. Puis, ces ondes acoustiques passent à travers le conduit auditif, en se comportant comme des ondes rectilignes sur une longueur d'environ deux à quatre centimètres, avant de rencontrer la membrane du tympan. Celui-ci se met alors à osciller sous l'effet des fluctuations de l'onde acoustique dans le conduit.

Le pavillon amplifie les sons de fréquences voisines de 5000 et 6000 Hz, tandis que le conduit auditif externe amplifie les sons de fréquences comprises entre 2000 et 5000 Hz. Celui-ci possède une fréquence de résonance autour de 3500 Hz, ce qui renforce dans cette bande de fréquence l'ensemble des bruits.

2. L'oreille moyenne

L'oreille moyenne ou caisse du tympan est une cavité remplie d'air délimitée du côté distal par la membrane tympanique et communique avec l'oreille interne par deux ouvertures percées dans la paroi osseuse : la fenêtre ovale (ou fenêtre du vestibule) et la fenêtre ronde (ou fenêtre de la cochlée). Elle communique également avec le nasopharynx par la trompe d'Eustache dont le rôle est de rééquilibrer les pressions de part et d'autre du tympan lors des phénomènes de bâillements et de déglutition. La rééquilibration de pression est indispensable au tympan qui ne peut vibrer librement que si les pressions exercées sur ses deux surfaces sont égales.

Le tympan est une membrane mince (100 μm) et translucide. Il s'agit de tissu conjonctif fibreux dont la face externe est recouverte de peau et la face interne d'une muqueuse. La membrane tympanique est fragile et déformable, elle se présente sous forme de cône aplati et pénètre par son sommet dans l'oreille moyenne.

L'oreille moyenne comporte la chaîne des osselets, située entre le tympan et la fenêtre ovale. Elle comprend trois petits os suspendus dans l'oreille moyenne par des ligaments : le marteau, l'enclume et l'étrier. Le marteau est rattaché au tympan. L'enclume s'articule avec le marteau et l'étrier par des articulations synoviales. La platine de l'étrier obture la fenêtre ovale (Figure 2).

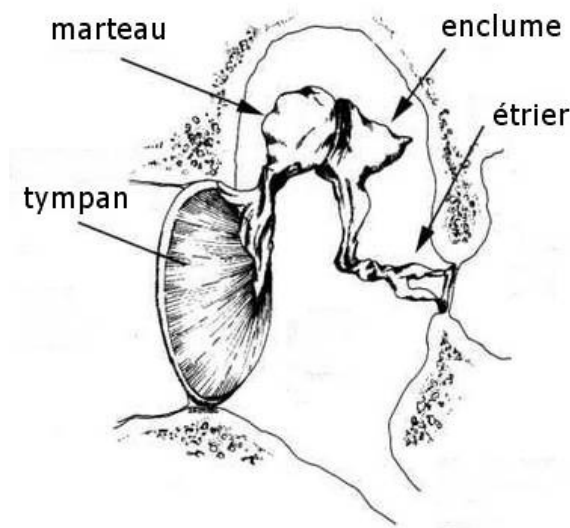


Figure 2 : Représentation schématique de la chaîne des osselets de l'oreille moyenne (d'après <http://www.techno-science.net>).

L'oreille moyenne a trois fonctions importantes : elle transmet les vibrations du milieu extérieur à l'oreille interne; elle joue un rôle d'adaptateur d'impédance, permettant aux ondes sonores de passer du milieu aérien au milieu liquidien; elle a aussi pour fonction de protéger l'oreille interne de certaines surstimulations par l'intermédiaire du réflexe stapédien.

Les ondes sonores font vibrer le tympan qui transfère cette énergie aux petits osselets. Les mouvements du tympan entraînent des mouvements identiques du dernier osselet : l'étrier. Cette chaîne des osselets entraîne une amplification des sons de l'ordre de 20 à 30 dB, entre 1000 et 10000 Hz avec un maximum vers 4000 Hz (comme l'oreille externe).

Si l'oreille moyenne fonctionne mal, l'amplification disparaît, il y a mauvaise transmission.

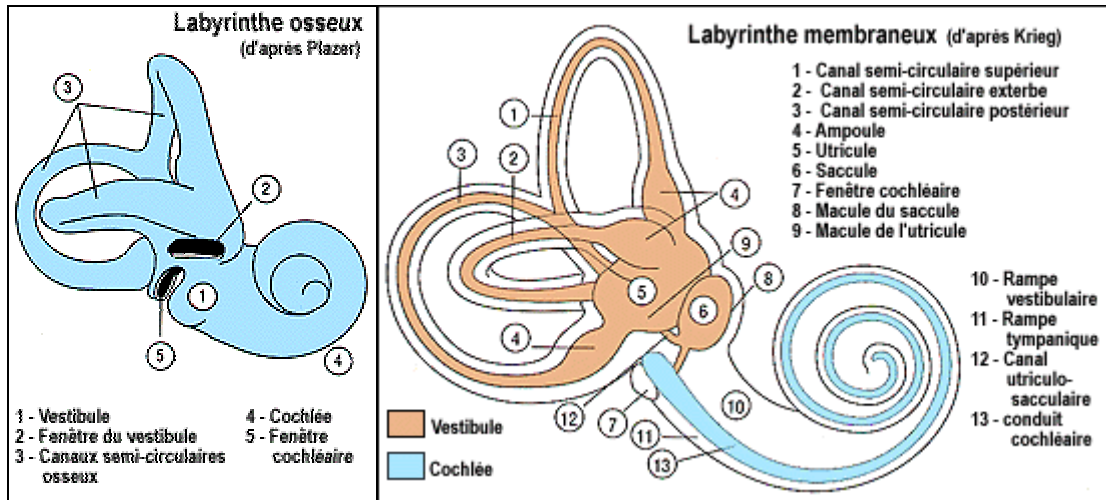
Deux minuscules muscles squelettiques se trouvent dans la caisse du tympan : le muscle du marteau et le muscle de l'étrier. L'action réflexe de ces muscles, déclenchée par les sons exceptionnellement forts (dès 85 dB), protège les récepteurs de l'audition. Plus précisément, le muscle du marteau tend le tympan en le tirant vers l'intérieur, et le muscle

de l'étrier atténue les vibrations de la chaîne des osselets ainsi que les mouvements de l'étrier dans la fenêtre ovale. Ce réflexe tympanique, ou réflexe stapédien (stapedius=étrier), diminue la propagation du son vers l'oreille interne. Comme il se produit après une période de latence de 40 ms, il ne protège pas les récepteurs contre les bruits impulsionnels, comme ceux des armes à feu. En fait, le réflexe stapédien est activé principalement par les sons de basses fréquences (Pujol, 1989).

3. L'oreille interne

L'oreille interne encore appelée labyrinthe, est creusée dans la pyramide pétreuse de l'os temporal. Elle comporte le labyrinthe osseux (Figure 3a), coque rigide abritant le labyrinthe membraneux (Figure 3b) qui contient les récepteurs sensoriels baignés par l'endolymphe. Les espaces compris entre les labyrinthes osseux et membraneux sont remplis de périlymphe. Deux parties sont distinctes dans l'oreille interne : antérieurement, la cochlée ou limaçon, organe de l'ouïe et postérieurement, le vestibule et les canaux semi-circulaires, organe de l'équilibre.

L'anatomie de l'organe de l'équilibre ne sera pas détaillée dans ce travail qui est essentiellement consacré à l'audition.



(3a)

(3b)

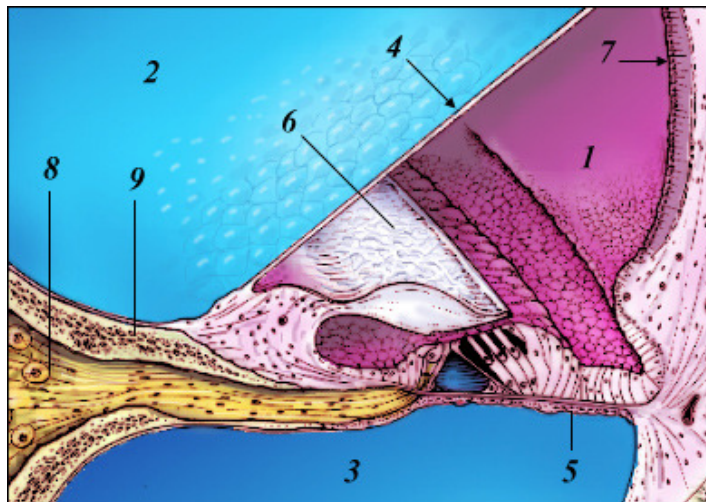
Figure 3 : Représentations schématiques des labyrinthes osseux et membraneux constituant l'oreille interne. (3a) labyrinthe osseux : la fenêtre du vestibule est la fenêtre ovale ; la fenêtre cochléaire est la fenêtre ronde. (3b) labyrinthe membraneux.

3.1 La cochlée : anatomie et histologie

Avec la forme d'une coquille d'escargot, la cochlée est un tube (columelle) creusé dans le rocher présentant deux tours et demi de spires (chez l'être humain). La columelle s'entoure autour d'un axe creux (modiolus) d'environ 35 mm de longueur renfermant le nerf cochléaire et les vaisseaux sanguins.

La paroi inférieure de la cochlée renferme l'organe de Corti comportant les cellules sensorielles auditives, ciliées à leur pôle supérieur et donnant naissance à leur pôle inférieur aux filets nerveux dont la réunion forme le nerf cochléaire ou auditif (VIII).

En vue transversale, la cochlée apparaît compartimentée en trois rampes sur toute sa longueur : la rampe tympanique (inférieure), la rampe vestibulaire (supérieure) et le canal cochléaire (médian) (Figure 4).



- 1 : Canal cochléaire (endolymphe)
- 2 : Rampe vestibulaire (périlymphe)
- 3 : Rampe tympanique (périlymphe)
- 4 : Membrane de Reissner
- 5 : Membrane basilaire
- 6 : Membrane tectoriale
- 7 : Strie vasculaire
- 8 : Ganglion
- 9 : Lame spirale osseuse

Figure 4 : Représentation schématique d'une coupe transversale de la cochlée (Extrait de « promenade autour de la cochlée » d'après Pujol et coll.)

La rampe vestibulaire, remplie de périlymphe, est séparée du canal cochléaire par la membrane de Reissner. A sa base se trouve la fenêtre ovale sur laquelle est appliquée la platine de l'étrier et par où les vibrations entrent dans la périlymphe. La rampe tympanique également remplie de périlymphe est séparée du canal cochléaire par la membrane basilaire. Les deux rampes communiquent à l'apex de la cochlée par l'hélicotrème. Les vibrations provenant de la rampe vestibulaire passent dans la rampe tympanique par l'hélicotrème et se propagent jusqu'à la base de la cochlée où elles sont amorties par la membrane recouvrant la fenêtre ronde. Le canal cochléaire renferme l'organe neurosensoriel de la cochlée : l'organe de Corti qui se compose de cellules de soutien et des cellules sensorielles ou cellules ciliées.

3.1.1 La lame spirale osseuse

La lame spirale osseuse s'entoure autour du modiolus et est traversée par les fibres nerveuses afférentes et efférentes. Au niveau de la partie externe de la lame spirale osseuse

se trouve le limbus spiral qui, avec la membrane tectoriale et l'organe de Corti, forme le sillon spiral interne.

3.1.2 Le mur latéral

Il se compose de la strie vasculaire et du ligament spiral.

La strie vasculaire est un épithélium richement vascularisé qui se compose de trois différents types de cellules : les cellules marginales, les cellules intermédiaires et les cellules basales (Smith, 1957). Les cellules marginales présentent des microvillosités indicatives d'interaction (absorption et/ou sécrétion) avec le fluide luminal leur permettant d'assurer le maintien de la composition ionique endolymphatique avec le concours de transporteurs ioniques (Raphaël et Altshuler, 2003). Entre les cellules marginales et intermédiaires se trouve un important réseau vasculaire (Wangemann et coll., 2000). Des échanges ioniques se font avec les capillaires présents au niveau de la strie vasculaire et du ligament spiral, les autres cellules de la strie vasculaire et les fibrocytes du ligament spiral jouant un rôle essentiel dans le recyclage du potassium.

Le ligament spiral est représenté par quatre différents types de fibrocytes : les fibrocytes de type I, II, III et IV. Ils ont été classés selon leur nombre et leurs propriétés de transports ioniques notamment (Spicer et Schulte, 1991). Les fibrocytes de type I présents le long de la strie vasculaire, de type III présents le long de l'os et de type IV présents dans la partie inférieure du ligament spiral expriment plus spécifiquement des enzymes telles que des anhydrases carboniques et des créatines kinases (enzymes ayant des rôles importants dans les fonctions physiologiques telles que la respiration, la régulation du pH et la sécrétion d'électrolytes) alors que les fibrocytes de type II contiennent exclusivement des pompes Na^+ , K^+ -ATPase.

3.1.3 Le ganglion spiral

Le ganglion spiral est un ensemble de fibroblastes, de cellules de Schwann et de corps neuronaux divisés en deux classes : les neurones de type I et les neurones de type II.

Les neurones de type I représentent environ 95 % des neurones du nerf auditif. Ces neurones entrent en contact avec les cellules ciliées internes de l'organe de Corti (environ une dizaine de connexions par cellule ciliée). Les neurones de type II non myélinisés représentent environ 5 % des neurones du nerf auditif. Ces neurones sont en contact avec les cellules ciliées externes de l'organe de Corti (un neurone innerve 10 à 20 CCE). L'ensemble des neurones de type I et II est relié au noyau cochléaire du tronc cérébral.

3.1.4 L'organe de Corti

L'organe de Corti est l'organe sensori-nerveux de la cochlée. Il se nomme ainsi car Alfonso Corti fut l'un des premiers anatomistes à en faire la description détaillée.

Il est composé de différentes membranes (la membrane tectoriale, la membrane de Reissner et la membrane basilaire), des cellules sensorielles (les cellules ciliées externes et internes), des fibres nerveuses qui leur sont connectées ainsi que des cellules de soutien (cellules de Claudius, cellules de Hensen, cellules de Deiters), et les cellules piliers du tunnel de Corti (Figure 5).

3.1.4.1 La membrane tectoriale

La membrane tectoriale est une structure fibreuse acellulaire rattachée au limbus spiral et reposant sur la face supérieure de l'organe de Corti. Sur sa face inférieure, la membrane

tectoriale entretient d'étroits contacts avec les stéréocils des cellules sensorielles. Son principal rôle est de transformer les mouvements verticaux de la membrane basilaire dus aux vibrations en mouvements horizontaux des cellules ciliées (Lim, 1986a ; Lim 1986b).

3.1.4.2 La membrane de Reissner

La membrane de Reissner sépare la rampe vestibulaire et le canal cochléaire. Elle est tendue du limbus spiral à la strie vasculaire. La membrane de Reissner est une structure avasculaire formée de deux couches cellulaires : une couche épithéliale tournée vers le canal cochléaire et une couche mésothéliale tournée vers la rampe vestibulaire (Hunter-Duvar, 1978).

La membrane de Reissner ne possède pas de rôle propre mais semble être impliquée dans le maintien du gradient électrochimique périlymphe/endolymphe via sa perméabilité et des transporteurs ioniques (Raphaël et Altschuler 2003).

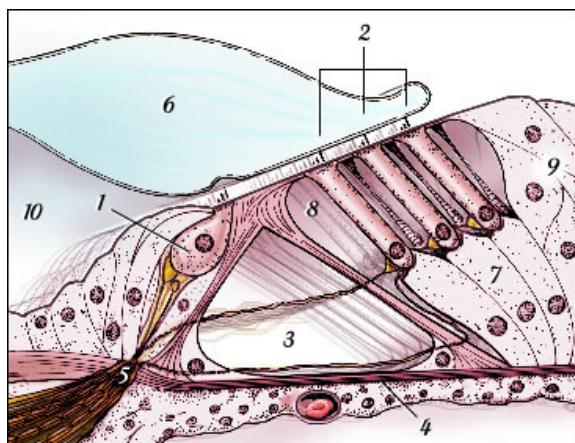
3.1.4.3 La membrane basilaire

Tendue du modiolus au ligament spiral sur toute la longueur de la cochlée, la membrane basilaire supporte l'organe de Corti avec lequel elle forme la cloison cochléaire. Composée d'une matrice extracellulaire, de fibrilles et de cellules mésothéliales dispersées, elle apparaît en vue transversale divisée en deux parties : une partie, dite zone arquée, allant du modiolus au pilier externe de Corti et une partie, dite zone pectinée, allant du pilier externe de Corti au ligament spiral (Cabezudo, 1978). Son épaisseur et sa rigidité varie de la base à l'apex de la cochlée : rigide et étroite à la base et mince et souple à l'apex. De ce gradient d'épaisseur et de rigidité découle la propriété de la tonotopie cochléaire (Cabezudo, 1978 ;

Raphaël et Altschuler, 2003). En effet, la membrane basilaire se comporte comme un analyseur fréquentiel : à chacun des composants fréquentiels du son incident correspond un point donné sur l'axe longitudinal de la membrane basilaire où se produit un déplacement maximal de la membrane. Cette conversion « fréquence/position » porte le nom de transformation tonotopique ou tonotopie (Cabezudo, 1978 ; Raphaël et Altschuler, 2003).

3.1.4.4 Les cellules ciliées

Les cellules ciliées sont les cellules sensorielles de l'audition. Elles sont de deux types : les cellules ciliées externes (CCE) ou cellules motrices et les véritables cellules sensorielles : cellules ciliées internes (CCI). Elles sont disposées en rangées parallèles de la base au sommet de la cochlée (une rangée de CCI et trois rangées de CCE). Ces cellules présentent des stéréocils à leur pôle apical. A leur base se trouve un important réseau nerveux de fibres afférentes et efférentes. (Figure 5)



- 1-Cellule ciliée interne (CCI)
- 2-Cellules ciliées externes (CCE)
- 3-Tunnel de Corti
- 4-Membrane basilaire
- 5-Habenula perforata
- 6-Membrane tectoriale
- 7-Cellules de Deiters
- 8-Espaces de Nuel
- 9-Cellules de Hensen
- 10-Sillon spiral interne

Figure 5 : Représentation schématique d'une coupe transversale de l'organe de Corti (Extrait de « promenade autour de la cochlée » d'après Pujol et coll.)

Cellules ciliées internes (CCI)

Accolées aux piliers du tunnel de Corti et entourées de cellules de soutien (figure 5), les cellules ciliées internes sont piriformes (longueur : 35 μm , diamètre à l'apex de la cellule : 10 μm) et sont de taille constante tout au long de la cochlée. Elles sont au nombre de 3500 à 4000 et sont disposées en une seule rangée. Les cellules ciliées internes assurent la transduction de l'énergie mécanique en énergie électrique (Pujol 1989 ; Raphaël et Altshuler 2003 ; Yamasoba et Kondo 2006). Les stéréocils du pôle apical sont ancrées via des protéines contractiles au nombre d'une centaine par CCI. Ces cils sont disposés en « U » sur trois rangées de taille croissante, les plus longs étant du côté externe (figure 6). Les stéréocils sont en contact avec la membrane tectoriale via la bandelette de Hensen. A leur pôle basal, les CCI sont en contact avec les neurones ganglionnaires de type I (Raphaël et Altshuler 2003) (Figure 6).

Cellules ciliées externes (CCE)

Les cellules ciliées externes sont beaucoup plus nombreuses, au nombre d'environ 12500. Elles sont disposées en trois rangées sur la membrane basilaire (figure 5). Elles sont de forme cylindrique à diamètre constant (6 μm) mais de longueur croissante de la base (25 μm) au sommet (45 μm) de la cochlée. A leur pôle apical, comme les CCI, elles présentent des stéréocils qui sont implantés dans la membrane tectoriale (contrairement à ceux des CCI) et décroissant de l'intérieur vers l'extérieur (Pujol 1989 ; Raphaël et Altshuler 2003 ; Yamasoba et Kondo, 2006). A leur pôle basal, les CCE sont en contact avec les neurones ganglionnaires de type II (Raphaël et Altshuler, 2003) (Figure 6). C'est Brownell et coll. (1985) qui démontrèrent pour la première fois que les CCE changeaient de longueur lorsqu'elles étaient soumises à des modifications de champ électrique, un phénomène appelé électromotilité. Les cellules ciliées externes sont ainsi de véritables cellules

motrices, les faces latérales de leurs corps cellulaires sont libres, leur permettant des mouvements de contraction/élongation. Ces mouvements sont possibles grâce à la présence d'une protéine « moteur », la prestine (Zheng et coll., 2000).

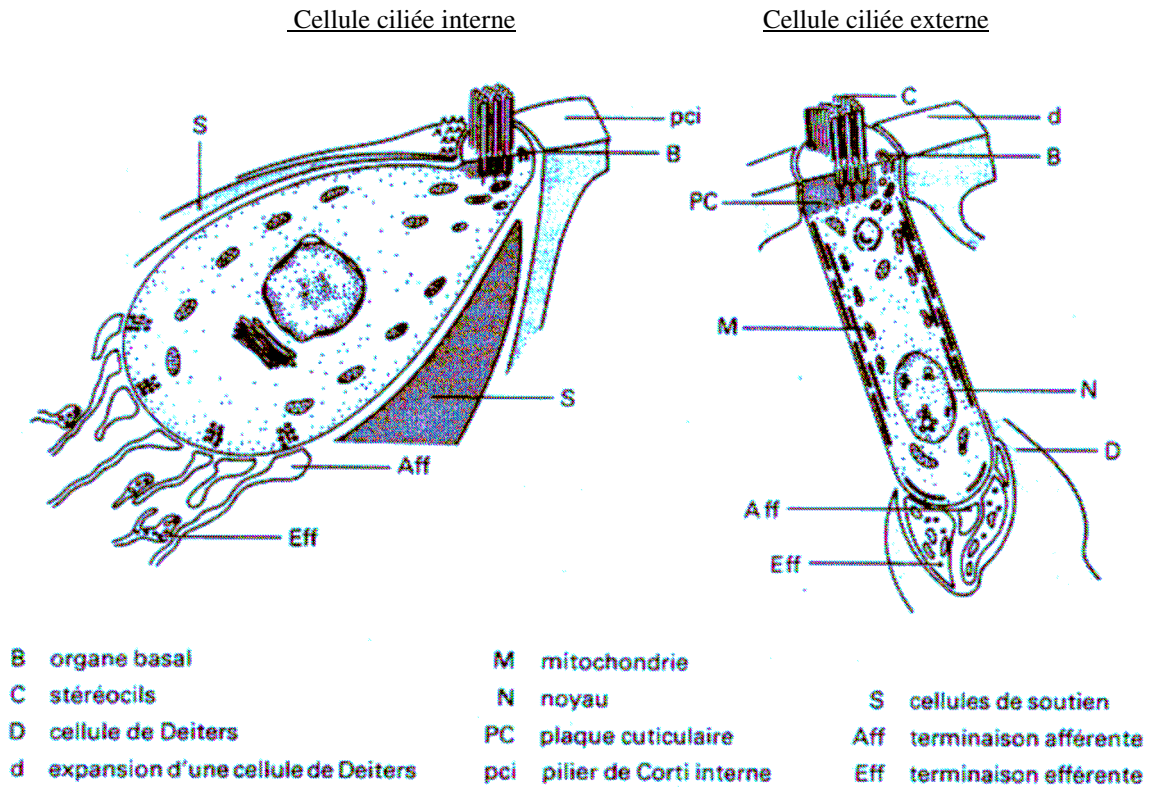


Figure 6 : Morphologie comparée des cellules ciliées de l'organe de Corti (D'après Galifret, 1978).

3.1.4.5 Les cellules de soutien

Elles supportent les cellules sensorielles et sont fixées sur la membrane basilaire.

- Les cellules piliers : de forme pyramidale, disposées en deux rangées externes et internes, elles sont distantes à leur base et se rejoignent au sommet afin de délimiter le tunnel de Corti.

- Les cellules de Deiters : cellules de soutien des CCE, fusiformes, elles délimitent entre elles les espaces de Nuel. Leurs pôles supérieurs sont déprimés en cupules pour recevoir la base des CCE.

- Les cellules de Hensen : situées en dehors des cellules de Deiters et caractérisées par la présence de granules lipidiques dans leur cytoplasme, elles constitueraient une réserve énergétique pour l'organe de Corti.

3.1.5 Les liquides de l'oreille interne

Les liquides de l'oreille interne ont un rôle dans la transmission de la stimulation mécanique ainsi qu'un rôle dans la transduction mécano-électrique en raison de leurs caractères électrochimiques. L'endolymphe remplit le canal cochléaire et la périlymphe remplit les rampes vestibulaires et tympaniques.

L'endolymphe, liquide extra-cellulaire, a une composition chimique originale car proche de celle du milieu intra-cellulaire : riche en potassium (150 à 180 mM) et pauvre en sodium (1mM). La périlymphe a une composition ionique proche d'un liquide extra-cellulaire : riche en sodium (150Mm) et pauvre en potassium (5mM). Entre ces deux compartiments liquidiens, il existe un gradient électrique, l'endolymphe étant chargée positivement par rapport à la périlymphe. Le potentiel endolympatique de la cochlée est compris entre 80mV et 100mV.

4. Physiologie auditive

Après avoir décrit l'anatomie du système auditif, comment celui-ci permet-il de percevoir et caractériser les sons ? Et qu'est-ce que le son ? Nous nous intéresserons particulièrement à la physiologie cochléaire.

Le son est une onde produite par la vibration mécanique d'un support fluide ou solide. C'est la partie audible des vibrations sonores. Il se caractérise par deux paramètres

physiques : son intensité et sa fréquence. L'intensité se mesure en décibel (dB) et s'obtient à partir de la pression P exprimée en Pascal (Pa) selon la formule suivante : $20 \log (P/P_0)$. La pression de référence P_0 est égale à $2 \cdot 10^{-5}$ Pa. Il s'agit de la pression correspondante au seuil d'audibilité chez l'Homme pour un son de fréquence 1000 Hz (0 dB). La fréquence se mesure en Hertz (Hz) et permet d'évaluer la hauteur du son. L'oreille humaine possède une bande passante entre 20 et 20000 Hz. Chaque zone de la cochlée est spécifique d'une fréquence donnée (tonotopie): la base de la cochlée répond aux hautes fréquences (sons aigus) alors que l'apex est spécifique des basses fréquences (sons graves) (Figure 7).

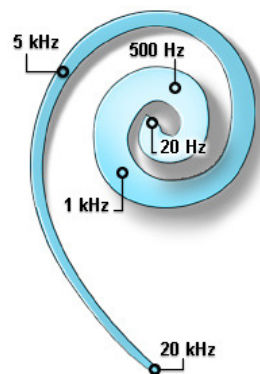


Figure 7 : Représentation schématique de la tonotopie cochléaire.

Etablir un audiogramme est la méthode qui permet de déterminer les seuils de perception de l'oreille : il s'agit d'un graphe permettant de matérialiser la perception des sons purs à des fréquences conventionnellement choisies. Ceci a permis de déterminer le champ auditif de l'homme (Figure 8).

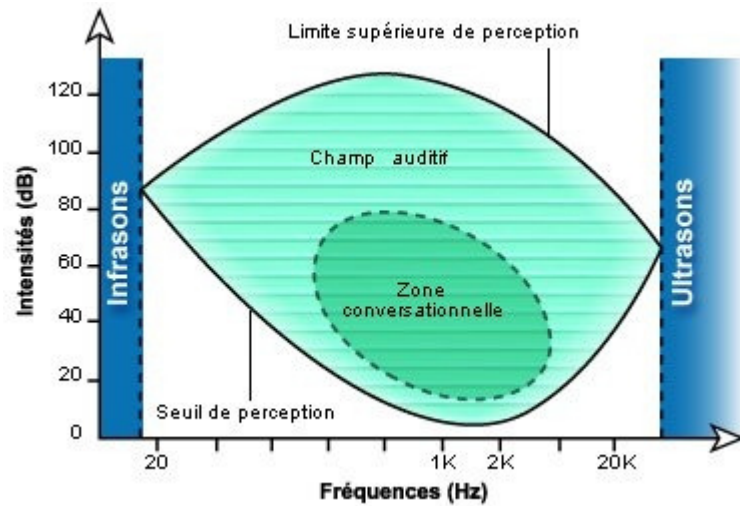


Figure 8 : Représentation schématique du champ auditif de l'homme. (Extrait de « promenade autour de la cochlée » d'après Pujol et coll.)

Du son au cortex auditif

Le son est recueilli au niveau du pavillon de l'oreille externe puis sa transduction se fait au niveau de l'oreille moyenne et de l'oreille interne. Après la fenêtre ronde, les vibrations sonores se propagent jusqu'à l'endolymphe du canal cochléaire puis vont être transmises à la membrane basilaire. La transduction mécano-électrique du signal sonore est réalisée par les CCI (Eybalin 1993 ; Raphaël et Altshuler 2003). La membrane basilaire vibre et fait bouger les cellules ciliées, leurs stéréocils sont ainsi étirés. Ces mouvements de cils activent des canaux neurosensoriels sélectifs au potassium. Il en résulte alors une entrée massive de potassium (K+) dans la cellule entraînant une dépolarisation, ce qui engendre une libération accrue de neurotransmetteurs au niveau basal et la naissance de potentiels d'action.

L'ouverture des canaux potassiques entraîne la repolarisation de la cellule. Ainsi, la danse rythmée des cils se transforme en une activité rythmée des fibres nerveuses du nerf auditif (potentiels d'action). (Puel et coll., 1995).

La neurotransmission des CCI vers les neurones de type I s'effectue via un système glutamatergique (Puel et coll., 1995) qui implique des récepteurs de type AMPA assurant une signalisation rapide (Ruel et coll., 1999). D'autres études ont montré un rôle moins important joué par des récepteurs NMDA (Jenison et coll., 1986 ; Puel et coll., 1991) (Figure 9).

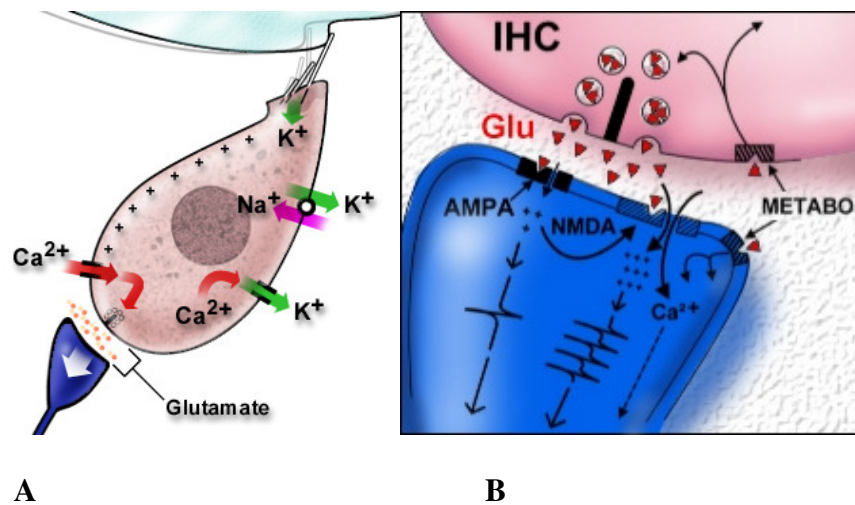


Figure 9 : A : Représentation schématique de la transduction mécano-électrique au niveau de la cellule ciliée interne B : Représentation schématique de la neurotransmission au niveau de la terminaison nerveuse afférente. Glu : glutamate (Extrait de « promenade autour de la cochlée » d'après Pujol et coll.)

Les CCE répondent de la même façon aux stimuli (mais avec les neurones de type II). Cependant ces CCE sont capables de s'allonger. Ce rapide changement de longueur est la caractéristique particulière des CCE, elles sont électromotiles. L'électromotilité des CCE permet d'amplifier la vibration initialement perçue. Elles ont été qualifiées d'amplificateur cochléaire. Ce phénomène permet une augmentation de la sensibilité et de la spécificité du système auditif (Kakehata et coll. 2000).

Le message est donc arrivé au niveau des neurones de type I et II qui vont le transmettre.

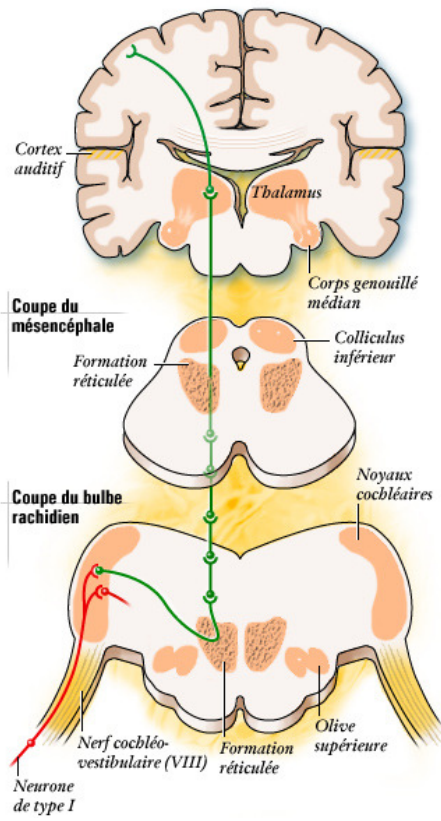
Le nerf auditif fait relai dans le noyau cochléaire dans le tronc cérébral. Les fibres nerveuses se répartissent selon leur fréquence caractéristique : les axones provenant des

cellules sensibles aux hautes fréquences arrivent dans la partie dorsale du noyau cochléaire alors que ceux provenant des cellules sensibles aux basses fréquences arrivent dans la partie ventrale. Cette répartition contribue à la tonotopie décrite précédemment. Les fibres arrivent ensuite au niveau du corps genouillé médian en passant par la formation réticulée et le colliculus inférieur avant de se projeter dans le cortex. (Figure 10A)

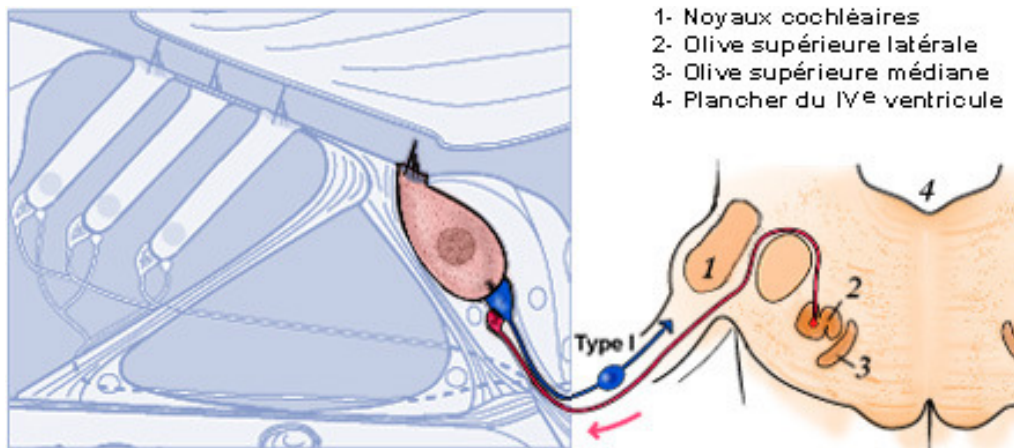
Les CCI font synapse avec tous les neurones de type I du ganglion spiral, formant le système afférent radial qui relie la cochlée aux noyaux cochléaires (Figure 10B). C'est par là que partent tous les messages auditifs vers le cerveau. Le système efférent latéral, issu de petits neurones de l'olive supérieure homolatérale (LSO), effectue un rétro-contrôle sur la synapse CCI/fibre afférente : il intervient notamment pour protéger cette synapse contre un accident excitotoxique (ischémie ou trauma) (Figure 10B).

Les CCE font synapse avec des terminaisons dendritiques de petite taille des neurones ganglionnaires de type-II, formant le système afférent spiral et sont directement innervées par les grosses terminaisons axoniques de neurones situés bilatéralement dans le complexe olivaire supérieur médian (MSO): c'est le système efférent médian dont le rôle est de modérer l'électromotilité des CCE (Figure 10C).

A



B



C

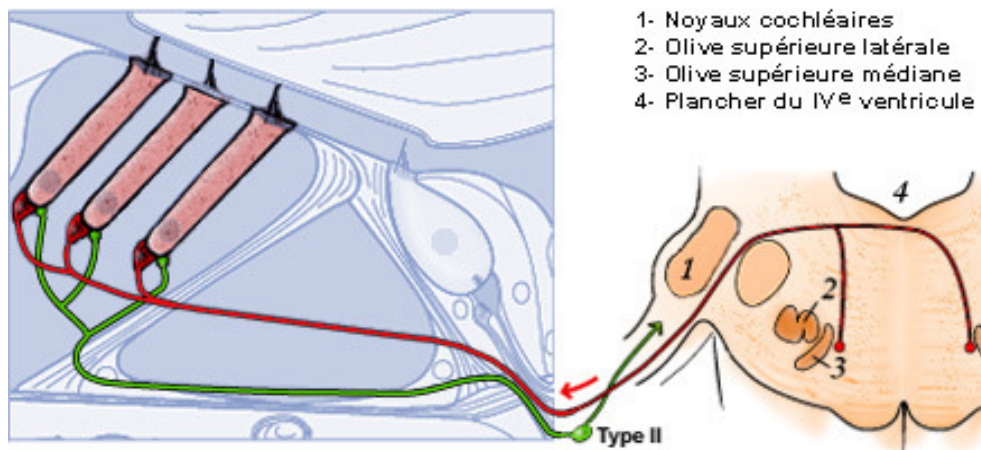


Figure 10 :

A : Représentation schématique des voies auditives de la cochlée au cortex auditif.

B : Représentation schématique de l'innervation de la cellule ciliée interne.

C : Représentation schématique de l'innervation de la cellule ciliée externe.

(Extrait de promenade autour de la cochlée, d'après Pujol et coll.)

De par cette organisation anatomique, l'ouïe constitue l'un des systèmes les plus élaborés.

Le système auditif est ainsi capable de détecter des déplacements de molécules d'air cent fois plus petits que le diamètre d'un atome d'hydrogène (10^{-12} m), de distinguer des sons séparés de 1/200 octave, de localiser une source sonore avec une précision de 1 degré.

Cependant, l'exposition de ce système ultra-sensible à un environnement sonore agressif peut aboutir à un traumatisme sonore.

CHAPITRE 2 : TRAUMATISME SONORE

Le traumatisme sonore consiste en une altération auditive provoquée par l'exposition de l'oreille à un bruit intense. Le bruit traumatisant peut être impulsionnel (intensité très élevée et durée courte) ou continu (intensité moins élevée mais durée d'exposition plus longue). On distingue le traumatisme sonore aigu, brutal et intense, et le traumatisme sonore chronique, qui s'installe plus progressivement.

Le traumatisme sonore, un problème de santé publique

Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour l'année 2005, 278 millions de personnes dans le monde souffrent d'une perte auditive modérée ou profonde bilatérale. Le milieu militaire est l'un des milieux professionnels les plus sujets aux traumatismes sonores aigus, le soldat étant souvent exposé aux bruits d'arme et explosions de très fortes intensités. Les pertes auditives dues au bruit chez le militaire restent un problème coûteux malgré des programmes de prévention. Les dommages dus à un traumatisme sonore représentent la quatrième raison pour laquelle le militaire en opération est contraint par prescription médicale à quitter sa mission (Kopke et coll., 2005). Selon un article publié dans CBS news health (mars 2008), en raison de la guerre en Irak et en Afghanistan, les militaires américains reviennent au pays en grand nombre avec des pertes auditives permanentes et des acouphènes. Les auteurs parlent d'une « épidémie militaire ». Selon les rapports d'audiologie militaire, 60 % des personnels américains exposés à des explosions souffrent de pertes auditives permanentes et 49 % souffrent d'acouphènes. Ces chiffres alarmants risquent d'augmenter de 18 % par an selon

l'association américaine des acouphènes (American Tinnitus Association). Le traumatisme sonore en milieu militaire représente donc un problème majeur.

Le traumatisme sonore, aspect clinique

La directive européenne 2003/10/CE met en place une réglementation concernant l'exposition au bruit des travailleurs. Les valeurs limites d'exposition correspondent à 140 dB (valeur crête) en bruit impulsionnel et à un niveau équivalent à 8 heures d'exposition quotidienne à une intensité de 87 dB pour un bruit continu. Quand ces valeurs sont dépassées, le risque traumatique est élevé.

Chez l'Homme, le traumatisme sonore aigu (TSA) conduit classiquement à une série de signes fonctionnels et de symptômes physiopathologiques. Trois symptômes majeurs peuvent être souvent isolés ou associés :

- une hypoacousie : une augmentation des seuils auditifs, plus ou moins intense, avec une impression d'oreille bouchée ou une gêne à l'audition dans le bruit.
- des acouphènes : la perception souvent immédiate d'un bruit anormal en l'absence de source sonore externe que la personne localise au niveau d'une ou des deux oreilles, ou plus diffusément dans toute la tête.
- une otalgie : une douleur localisée à une ou aux deux oreilles, de durée variable.

Dans certains cas, il s'y associe une perception douloureuse de certains sons ou hyperacousie (sensibilité anormale aux bruits ambiants accompagnée d'un abaissement du seuil auditif) ou une diplacousie gênant la localisation des sons. Dans le cadre d'accident aigu, les manifestations extra-auditives peuvent apparaître (troubles brefs de l'équilibre, céphalées, asthénie, anxiété, troubles visuels).

Au niveau fonctionnel, on distingue la fatigue auditive qui suit un traumatisme sonore et qui a une durée limitée, des pertes auditives qui sont définitives. La fatigue auditive (ou ETS : élévation temporaire des seuils) se traduit par une diminution de la sensibilité auditive limitée dans le temps. Elle dure de quelques secondes à 16 heures au maximum, cette limite ayant été fixée arbitrairement. Elle dépend des caractéristiques du traumatisme sonore : intensité, durée, fréquence de la stimulation, mode de stimulation (intermittent ou continu). La perte auditive définitive (ou EPS : élévation permanente des seuils) se caractérise par son irréversibilité. Différents niveaux de pertes auditives peuvent être distingués. Une étude épidémiologique a classé les types de surdité selon leur degré de pertes auditives et selon leur répartition dans la population (tableau 1).

Répartition des surdités selon le degré de perte auditive en décibels (dB)

Types de surdité	Degré de perte auditive* (dB)	Répartition (%)
Légère	20-40	53
Moyenne	40-70	
Sévère	70-90	21
Profonde	>90	25

*intervalles couramment retenus pour classer les surdités par degré

Tableau 1: Répartition des surdités. (D'après Fortnum et coll., 2002)

Physiopathologie du traumatisme sonore

Récemment, de nombreux travaux ont permis de comprendre les mécanismes physiopathologiques du traumatisme sonore aigu. Cette physiopathologie regroupe l'ensemble des mécanismes conduisant à l'altération des phénomènes actifs cochléaires. Ces mécanismes peuvent être de nature mécanique ou métabolique et aboutissent à différents types de lésions anatomiques.

1. Conséquences mécaniques d'une surexposition au bruit :

Au niveau de la cochlée, les effets mécaniques constituent le phénomène pathologique majeur lors d'une surexposition au bruit. Les vibrations sonores transmises aux liquides de l'oreille interne provoquent des déplacements de la membrane basilaire qui supportent l'organe de Corti. L'amplitude de l'onde est maximale à la base pour les hautes fréquences et à l'apex pour les basses fréquences : c'est la base de la tonotopie qui conduit alors à une répartition des lésions le long de l'organe de Corti en fonction des fréquences du bruit lésionnel.

Sous l'effet des ondes sonores, les mouvements de la membrane basilaire induisent des cisaillements des stéréocils des cellules ciliées. Lorsque l'oreille est exposée à des stimulations très élevées, les déplacements vont excéder la résistance mécanique des structures et conduire à leur destruction. On observe alors un désamarrage des cils de la membrane tectoriale et une désolidarisation des ponts interciliaires (Dancer, 1991). Les lésions par rupture de la membrane basilaire apparaissent lorsque son élongation dépasse un dixième de sa longueur. La rupture complète se produit lorsque l'élongation de la membrane basilaire atteint le double de sa longueur, ce qui correspond à une intensité de 174 dB (Cudennec et coll., 1994).

2. Conséquences métaboliques d'une surexposition au bruit :

Les bruits peuvent agir sur le métabolisme des cellules sensorielles de l'organe de Corti ainsi qu'au niveau des synapses afférentes situées sous les cellules ciliées internes.

Cette altération cellulaire est plus progressive, ce qui explique l'évolution du traumatisme sonore sur l'audition plusieurs heures voire plusieurs jours après l'exposition.

Les mécanismes métaboliques sont de diverses natures.

2.1 Mécanismes ioniques

Les cellules ciliées baignent dans l'endolymphe, un liquide riche en potassium (150 mM). Lors du traumatisme sonore, il apparaît un influx de potassium via des canaux à induction mécano-électrique situés au sommet des stéréocils (Hudspeth et Gillespie, 1994). Ceci conduit à la dépolarisation des cellules ciliées, la mise en mouvement des cellules ciliées externes ainsi qu'à la libération de neurotransmetteurs (glutamate) par les cellules ciliées internes. Or, le potassium en forte concentration peut être toxique pour les cellules ciliées (Zenner, 1986). De plus, la rupture des jonctions gap par un bruit intense, au niveau du mur latéral, est vraisemblablement à l'origine d'une dérégulation potassique capable d'affecter l'organe de Corti (Ohlemiller, 2008).

Le traumatisme sonore active également les canaux calciques voltage dépendant conduisant à l'entrée excessive de calcium (Fuchs, 1996). Ceci peut entraîner la formation de radicaux libres (Mattson, 1996). De plus, l'augmentation du calcium intracellulaire entraîne l'activation de protéines calcium dépendantes : les calpaines. Ce sont des protéases activées par le calcium qui favorisent la désorganisation du cytosquelette et des protéines membranaires, une des étapes de la mort cellulaire programmée ou apoptose. Les calpaines ont fait l'objet d'une étude expérimentale dans ce travail de thèse. L'augmentation de calcium active également des kinases, des phosphatases et des facteurs de transcription (Bartus et coll., 1995).

2.2 Ischémie / hypoxie

Un stimulus sonore important induit une vasoconstriction qui peut également s'observer dans la microcirculation cochléaire conduisant à une hypoperfusion de la cochlée (Hawkins et coll., 1972, Seidman et coll., 1999). D'autres auteurs ont montré plutôt une augmentation du débit sanguin cochléaire (Perlman et Kimura, 1962) voire une absence de modification (Prazma et coll, 1988). Ces divergences peuvent s'expliquer par la variabilité des stimuli, des animaux et des méthodes de détection employées. La réduction en apport sanguin dans la cochlée est vraisemblablement responsable d'une partie des pertes auditives en cas de traumatisme sonore (Seidman et coll. 1999). Ceci a été confirmé plus récemment par Nakashima et coll. (2003). Ohinata et coll. (2000) ont été les premiers à établir un lien de cause à effet entre la production de radicaux libres (cf 2.4) et la diminution du flux sanguin cochléaire. L'administration locale dans le flux sanguin cochléaire (au niveau de l'artère cérébrale antérieure et inférieure) de 8-iso-prostaglandine- $F_{2\alpha}$ (8-iso-PGF $_{2\alpha}$) (un puissant vasoconstricteur, produit de la peroxydation lipidique) diminue le flux sanguin cochléaire et son administration systémique (intraveineuse) provoque également la vasoconstriction cochléaire (Miller et coll., 2003). En résumé, l'exposition à un bruit intense engendre la formation de radicaux libres, particulièrement dans les tissus associés aux vaisseaux cochléaires (le mur latéral) ; ces radicaux libres provoquent la peroxydation des lipides et la formation de 8-iso-PGF $_{2\alpha}$, puissant vasoconstricteur cochléaire. Les radicaux libres formés et la diminution consécutive du flux sanguin cochléaire provoquent une ischémie qui induit encore plus de radicaux libres. Il existe donc une boucle de rétroaction positive lors de la surexposition au bruit. Plus récemment, l'expression du facteur de croissance endothélial (VEGF, vascular endothelial growth factor) a été étudiée dans un modèle de traumatisme sonore (bruit continu de 30

min à 120 dB centré à 6 kHz) chez le cobaye (Picciotti et coll, 2006). Les auteurs ont montré une augmentation dans l'expression du VEGF chez les animaux traumatisés, en particulier au niveau de la strie vasculaire et du ligament spiral. Par contre, les niveaux d'expression des récepteurs au VEGF restent inchangés. Le VEGF a donc un rôle important dans la régulation du réseau vasculaire dans l'oreille interne après traumatisme sonore (Picciotti et coll., 2006). L'ensemble de ces connaissances permet d'orienter les recherches vers des thérapeutiques à visée vasculaire, qui seront développées dans le chapitre suivant.

2.3 Excitotoxicité glutamatergique

Le glutamate est le principal neurotransmetteur des fibres afférentes faisant synapse avec les cellules ciliées internes. En plus de ses propriétés excitatrices, le glutamate est connu pour ses propriétés neurotoxiques lorsqu'il est libéré en quantité excessive ou incomplètement recyclé. Dans la cochlée, l'excitotoxicité glutamatergique peut survenir dans deux cas : lors d'anoxie et suite à un traumatisme sonore. Elle se déroule en deux étapes (Pujol et Puel, 1999). Dans un premier temps, un gonflement des afférences cochléovestibulaires apparaît. En effet, les récepteurs ionotropiques AMPA/kainate ouvrent les canaux sodiques sous l'influence de l'accumulation du glutamate et provoque ainsi l'influx de sodium et d'eau. Une perturbation des structures post-synaptiques (dendrites afférentes de type I) est également observée, entraînant une perte de fonctionnalité. Dans les cinq jours, une réparation synaptique avec une récupération partielle ou totale des pertes auditives se met en place (Puel et coll., 1998). Dans un second temps, une cascade d'évènements métaboliques peut apparaître, déclenchant l'entrée de calcium dans les fibres afférentes, ce qui aboutit à la mort neuronale des ganglions spinaux.

Récemment, le rôle de l'excitotoxicité glutamatergique dans la physiopathologie du traumatisme sonore a été confirmé par des études basées sur l'utilisation de substances antagonistes au glutamate comme le carbamathione (Kopke et coll., 2002). Le carbamathione diminue les pertes auditives consécutives au bruit chez l'animal, confirmant ainsi le rôle de la toxicité du glutamate dans les pertes auditives dues au bruit. Une étude plus récente basée sur l'utilisation d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques a abouti à la même conclusion. En effet, après un traumatisme sonore chez le cobaye (bruit blanc pendant 1h à 110 dB), l'acide kynurenique (antagoniste des récepteurs au glutamate) administré localement dans la cochlée, protège les neurones du ganglion spinal des lésions, ce qui diminue les pertes auditives (Zhang et coll., 2007). Ces études confirment ainsi le rôle de la libération excessive de glutamate dans les conséquences lésionnelles du traumatisme sonore et ouvrent la voie des recherches vers une stratégie thérapeutique adaptée pouvant atténuer cette toxicité.

2.4 Radicaux libres et stress oxydant

Il y a plus de 30 ans, Lim et Melnick (1971) avaient observé qu'une activité métabolique intense contribuait aux dommages de l'oreille interne exposée au bruit. Ce fait a été confirmé avec les expériences de Yamane et coll. (1995) qui observent après un traumatisme sonore, une augmentation des dérivés réactifs de l'oxygène dans l'oreille interne. Il s'agit de radicaux libres de l'oxygène : on trouve le radical superoxyde ($\bullet\text{O}_2^-$), le radical hydroxyl ($\bullet\text{OH}$), le monoxyde d'azote ($\text{NO}\bullet$) mais aussi des dérivés oxygénés réactifs non radicalaires et toxiques tels le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le peroxyde d'azote (ONOO^-). Dans certaines conditions, notamment en situation de stress, leur production augmente fortement et on parle alors de stress oxydatif (Batandier et coll., 2002). Les

dérivés réactifs de l'oxygène sont produits au niveau des mitochondries de façon continue et ubiquitaire (Turrens et coll., 1985). Au cours d'un traumatisme sonore, les mitochondries seraient secondairement endommagées et produiraient des quantités importantes de radical superoxyde. De plus, les cellules phagocytaires synthétisent le radical superoxyde par l'intermédiaire de la NADPH oxydase qui s'active avec le traumatisme. On observe alors la production de peroxyde d'hydrogène et d'ions hypochlorites indispensables pour détruire le matériel phagocyté (Novelli, 1997). Plus récemment, Henderson et coll. (2006), ont apporté la preuve que l'exposition au bruit conduit à une plus forte activité mitochondriale et à la production de radicaux libres, réduit le flux sanguin cochléaire et induit la mort des cellules sensorielles à la fois par nécrose et apoptose. Fontaine (2001) avait déjà observé qu'en cas d'ischémie cochléaire engendrée par un traumatisme sonore, le stress oxydatif était favorisé.

Les ions métalliques comme le fer et le cuivre participent à la formation de radicaux in vitro : ils transforment le peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyl encore plus toxique. En situation physiologique, ces ions métalliques sont séquestrés par des protéines empêchant cette réaction d'avoir lieu. Cependant, lors de destructions cellulaires, la libération de ces métaux engendre un stress oxydatif. Ainsi, l'administration d'un chélateur de fer réduit les lésions cochléaires après traumatisme sonore (Yamasoba et coll., 1999).

L'organisme se défend lors d'un stress oxydatif grâce à la présence de protecteurs endogènes (les scavengers). La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme qui convertit l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est ensuite dismuté en oxygène et en eau par la catalase ou alors transformé en eau lors d'une réaction couplée à l'oxydation du glutathion par l'enzyme glutathion reductase. Les scavengers liposolubles comme l'alpha-tocophérol (vitamine E), l'ubiquinol (forme réduite du coenzyme Q) sont concentrés dans les membranes cellulaires où ils sont efficaces pour limiter la peroxydation lipidique. En

milieu hydrosoluble, de nombreuses molécules ont un pouvoir antioxydant. C'est le cas de la vitamine C, l'acide urique, l'albumine et la bilirubine.

En utilisant des marqueurs des radicaux libres tels le 4-hydroxynonanal (4-HNE) et la nitrotyrosine (NT), l'équipe de Yamashita a observé un pic dans la production de ces radicaux libres dans les cellules de l'organe de Corti 7 à 10 jours suivant le traumatisme sonore (Yamashita et coll., 2004). Ces résultats suggèrent la possibilité d'utiliser des traitements anti-oxydants tardifs efficaces pouvant contrecarrer le stress oxydatif induit par le traumatisme sonore.

2.5 La mort cellulaire programmée ou apoptose

Dans la littérature, de nombreux auteurs ont étudié l'apoptose des cellules ciliées après traumatisme sonore. Ils s'accordent tous à attribuer à l'apoptose un rôle important dans la poursuite des lésions cellulaires (Pirvola et coll. 2000 ; Hu et coll. 2000 ; Hu et coll. 2002 ; Hu et coll. 2006 ; Nicotera et coll. 2003 ; Wang et coll. 2003 ; Yang et coll. 2004). Dans ce travail de thèse sur les stratégies thérapeutiques du traumatisme sonore, des agents anti-apoptotiques ont été testés en tant qu'outil thérapeutique. Nous développerons donc plus particulièrement les mécanismes de la mort cellulaire par apoptose.

Qu'est ce que l'apoptose ? Quel est le tableau physiologique de la cellule apoptotique ?

Dans l'organisme, de nombreux stimuli tels que la privation de facteurs de croissance, les irradiations aux UV, l'hypoxie et bien d'autres, conduisent à la mort de la cellule. La cellule décide alors elle-même de sa propre destruction, on parle de mort cellulaire programmée ou apoptose. Celle-ci est un processus non inflammatoire qui participe au

maintien de l'homéostasie tissulaire et au développement embryonnaire. L'apoptose conduit à l'élimination des cellules excédentaires ou potentiellement dangereuses pour l'organisme. La morphogénèse des doigts, la mise en place des systèmes nerveux et immunitaires sont des étapes de l'embryogénèse qui sont des exemples classiques d'apoptose. Les premières observations de mort par apoptose ont été faites par Flemming en 1885 mais ce n'est que dans les années 1970 que Kerr et ses collaborateurs (1972) introduisent la notion d'apoptose dans le vocabulaire biologique et médical. L'origine du terme apoptose fait référence à la chute programmée des feuilles à l'automne (en grec : *apo* pour éloignement et *ptose* pour chute). L'apoptose désigne un tableau morphologique cellulaire associant condensation cytoplasmique et chromatinienne, fragmentation de l'ADN, externalisation de la phosphatidylsérine membranaire conduisant rapidement à la phagocytose des cellules mortes. Il existe d'autres tableaux morphologiques de mort cellulaire telle que la mort par nécrose (Searle et coll., 1982 ; Fiers et coll., 1999), ou la mort par vacuolisation (Clarke, 1990 ; Schwartz et coll., 1993 ; Zakeri et coll., 1995). Les types de mort cellulaire diffèrent également par leur mécanisme selon qu'elles font ou non intervenir des protéases à cystéines particulières appelées caspases. La plupart des morts cellulaires lors du développement embryonnaire sont programmées pour leur survenue et pour leur déroulement et incluent une activation des caspases. Cependant, les relations entre morphologie, mécanismes et programme de survenue peuvent être moins schématiques qu'il n'est classiquement considéré. Par exemple, la nécrose peut également être programmée, comme chez certains mutants chez la souris (Chautan et coll., 1999).

Depuis 30 ans, de nombreuses recherches s'appliquent à décrypter l'ensemble des mécanismes de la mort cellulaire programmée. Cette mort cellulaire programmée joue un rôle crucial au sein de l'organisme. En effet, des dysfonctionnements de l'apoptose peuvent conduire à des maladies neurodégénératives du système nerveux comme la

maladie de Parkinson ou d'Alzheimer. De même, une inhibition de ce système lors de dommages sévères de l'ADN peut conduire au processus de cancérisation.

Différences entre cellule nécrotique et cellule apoptotique

Les études menées depuis quelques années ont permis de bien différencier les différents types de mort cellulaire. Plusieurs différences morphologiques et biochimiques existent entre l'apoptose et la nécrose (Figure 11). Tout d'abord la nécrose est considérée comme une mort incontrôlée et anarchique. Elle apparaît aux bornes extrêmes des conditions physiologiques. Sous l'action d'une agression, la cellule va perdre sa capacité à maintenir son équilibre osmotique, ce qui conduit à une entrée d'eau et d'ions. La cellule se met à gonfler, sa membrane se rompt et le contenu cytoplasmique comprenant des enzymes lysosomiales est déversé dans l'espace extracellulaire. Lors de la nécrose, l'ADN est fragmenté de manière aléatoire par des enzymes de type sérines protéases (Dong et coll., 1997). La mort cellulaire par nécrose est associée à un dommage important au niveau cellulaire entraînant une réponse inflammatoire intense (Kanduc et coll., 2002). La nécrose ne requiert pas d'énergie nécessaire sous forme d'ATP.

A contrario, l'apoptose est considérée comme une mort contrôlée car elle est sous la dépendance de certains gènes. La cellule apoptotique diminue de volume et sa densité augmente. Les organites cytoplasmiques ne sont pas modifiés et les enzymes lysosomiales ne sont pas libérées. On observe alors une figure caractéristique avec un cytoplasme très condensé mais des organites intacts (Cohen, 1993). Au cours de cette réduction de volume, les transglutaminases cellulaires sont activées et créent des liaisons entre les protéines. Elles sont responsables de la formation d'une structure rigide de protéines « transglutaminées » dans le cytoplasme de la cellule apoptotique (Fesus et coll., 1987).

Lors de cette phase, le noyau se condense également, la chromatine se condense rapidement et se fragmente en petits lobes entourés par la membrane nucléaire (Earnshaw, 1995). La fragmentation de l'ADN est régulière, elle lui donne un aspect en barreaux d'échelle, dû à l'apparition de fragments multiples de 180 paires de bases (pb) caractéristiques en gel d'électrophorèse classique en agarose (Israels et Israels, 1999). La lyse de la membrane cellulaire et la formation des corps apoptotiques constituent la dernière étape du processus apoptotique. Pendant toute la durée du phénomène, les cellules demeurent donc imperméables aux colorants vitaux. L'élimination des corps apoptotiques s'opère par phagocytose, ce qui permet d'éviter la libération du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire et donc le déclenchement d'une réaction inflammatoire (Lo et coll., 1995). Un des systèmes de reconnaissance des corps apoptotiques par les macrophages est l'externalisation de la phosphatidylsérine. En effet, l'asymétrie phospholipidique de la bicouche lipidique est une des caractéristiques de la membrane plasmique. Les phospholipides comme la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine sont retrouvés sur la face interne alors que la phosphatidylcholine se trouve sur la face externe de la bicouche lipidique. A l'état physiologique, l'asymétrie est maintenue activement par une translocase ATP dépendante. Durant l'apoptose, la perte de l'activité de la translocase ou l'activation d'autres enzymes comme les scramblases conduisent à une translocation de la phosphatidylsérine sur la face externe de la membrane plasmique (Martin et coll., 1995). Cette translocation est un signal pour la phagocytose de ces cellules ou de ces corps apoptotiques. L'espace extracellulaire n'est pas endommagé par une réaction inflammatoire. (Tableau 2 : différences entre nécrose et apoptose)

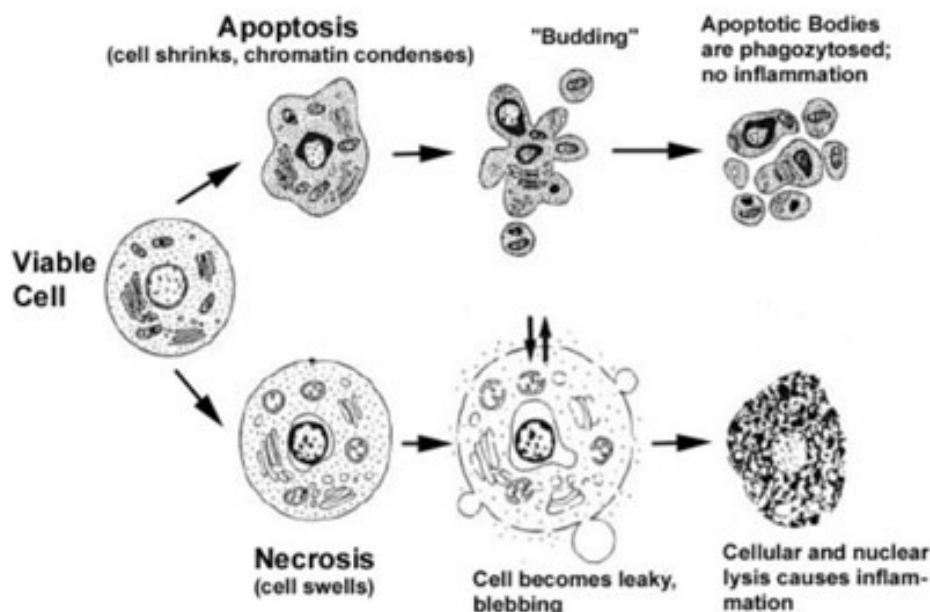


Figure 11 : Différences morphologiques entre cellule apoptotique et cellule nécrotique. (D'après Kerr et coll., 1972). Haut du schéma : évènements initiaux de l'apoptose : densification et margination de la chromatine nucléaire, condensation cytoplasmique. Au stade plus avancé, les fragments nucléaires et les protubérances formées se séparent en corps apoptotiques qui sont phagocytés par les cellules voisines. Bas du schéma : le développement de la nécrose est caractérisé par des cassures aléatoires de la chromatine, une augmentation de la taille des organelles et une rupture des membranes

	APOPTOSE	NECROSE
Evènement	Actif, programmé (activations de gènes spécifiques)	Passif, accidentel
Stimulus	Physiologique ou pathologique	Pathologique
Volume cellulaire	Diminution	Augmentation
Chromatine	Condensation	Pas de condensation
Organites	Maintien global	Dilatation du réticulum endoplasmique, des mitochondries
Membrane plasmique	Perte tardive d'assymétrie : la phosphatidylsérine passe sur le feuillet externe. Bourgeonnement, constitution de corps apoptotiques	Rupture cellulaire
Cellules voisines	Phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages	Libération du contenu intracellulaire (dont substances inflammatoires au contact des cellules voisines qui sont lésées)
Inflammation	Non	Oui
ADN	Fragmentation internucléosomale régulière (échelle)	Fragmentation irrégulière, aléatoire

Tableau 2 : Tableau comparatif entre apoptose et nécrose

On sait que toute cellule de l'organisme est en état de mort imminente et ne survit que si elle reçoit de son environnement des signaux moléculaires qui inhibent son suicide. L'apoptose peut être induite par la carence en facteur de croissance (NGF ; IL-2), par certains récepteurs membranaires (Fas ; TNF) ou nucléaires (glucocorticoïdes) lorsqu'ils interagissent avec leurs ligands, par des dommages cellulaires (radiations ionisantes, agents cytotoxiques, chocs osmotiques, hyperthermie...). Tous ces signaux sont intégrés par la cellule qui, en fonction de son génotype et de son état physiologique, va orienter sa réponse soit vers la mort, soit vers la survie, la prolifération ou la différenciation. Cette intégration fait appel à un certain nombre d'acteurs moléculaires intracellulaires anti- et/ou pro-apoptotiques. En dépit de la diversité de ces signaux, toutes les cellules engagées vers une mort programmée présentent des modifications morphologiques et biochimiques similaires, ce qui suggère l'existence d'une phase effectrice commune quel que soit le type cellulaire. Cette signalisation aboutit à l'activation irréversible de molécules effectrices. Les principaux effecteurs identifiés à ce jour et conduisant à la destruction de la cellule sont des protéases à cystéine, communément appelées caspases (terme relatif à cysteine aspartate protease), appartenant à la famille de ICE (interleukine-1b converting enzyme) et les nucléases. Les caspases s'attaquent aux protéines dont la dégradation aboutit soit à la perte de leur fonction, soit à l'acquisition de nouvelles activités. Les nucléases s'attaquent à la chromatine. Tous ces processus aboutissent au final à la mort de la cellule.

Les voies principales de l'apoptose

Chez les mammifères, il existe deux voies principales conduisant à la mort cellulaire par apoptose : la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale. Ces deux voies convergent jusqu'à l'activation des caspases et en particulier la caspase-3. Nous aborderons également la voie du réticulum endoplasmique ainsi que l'apoptose

indépendante des caspases. Les deux voies principales conduisant à l'apoptose sont illustrées figure 13.

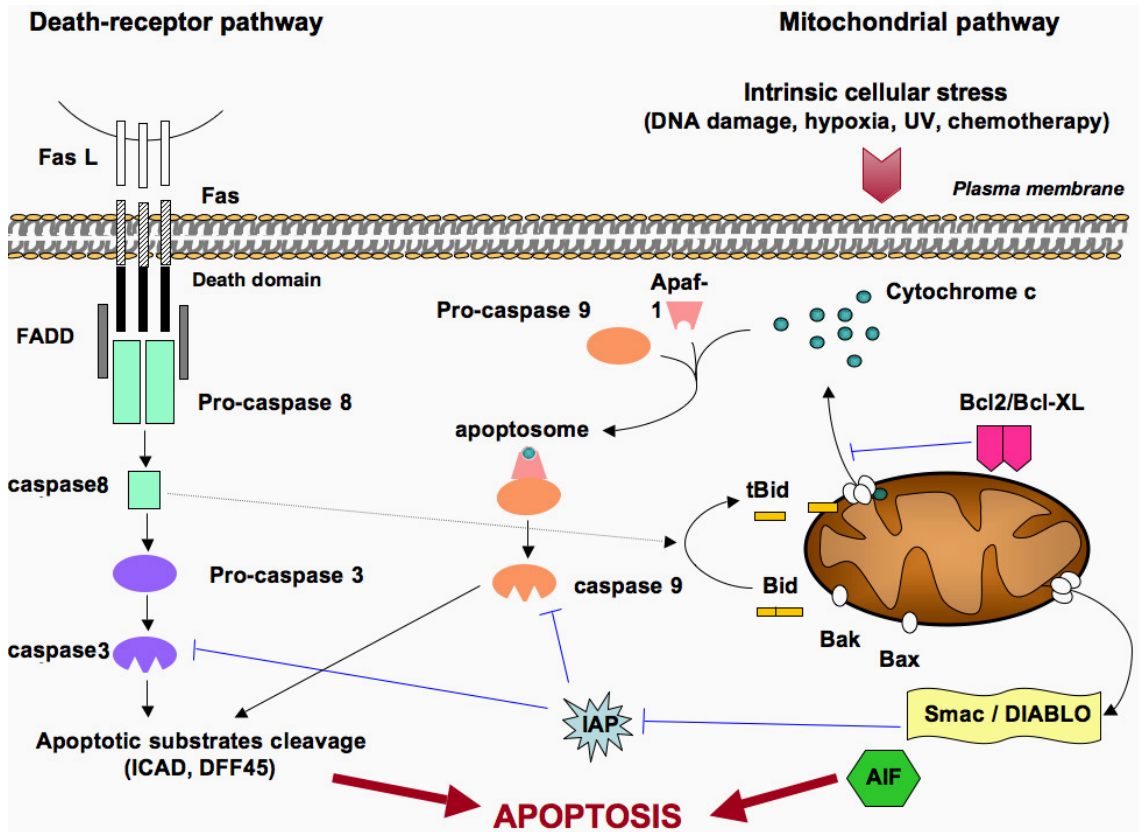


Figure 12 : Principales voies conduisant à l'apoptose. (D'après Bellance et coll., 2009)

- Voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque

Les récepteurs de mort sont des récepteurs membranaires sur lesquels se fixent des ligands spécifiques. Sous l'effet d'un stimulus, ces récepteurs conduisent à l'activation des caspases. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs « Tumoral Necrotic Factor » ou TNF-R. Le TNF-R connu est le récepteur Fas, appelé aussi CD95 ou Apo1 (Itoh et coll., 1991 ; Oehm et coll., 1992). La mort induite par les membres de la famille TNF-R est dépendante des caspases (Enari et coll., 1995 ; Longthorne et Williams, 1997).

Lorsqu'il est stimulé, Fas forme un trimère qui recrute une protéine adaptatrice FADD/MORT1 (Chinnaiyan et coll. 1996) (Figure 13). FADD possède également un domaine effecteur nécessaire pour induire l'apoptose (Chinnaiyan et coll. 1996). FADD recrute ensuite la caspase 8 (Boldin et coll., 1996; Fernandes-Alnemri et coll., 1996 ; Muzio et coll., 1996) ou la caspase 10 (Fernandes-Alnemri et coll., 1996 ; Vincenz et Dixit, 1997) et initie la cascade apoptotique (Hirata et coll., 1998).

- La voie des mitochondries ou voie intrinsèque

Au sein de la cellule, la mitochondrie a un rôle central dans l'orchestration de l'apoptose. En effet, la mitochondrie représente un carrefour entre mort et survie, entre nécrose et apoptose (Zamzami et coll., 1996 ; Kroemer, 1997 ; Brenner et coll., 1998). La mitochondrie présente des pores situés sur sa membrane externe. Sous l'effet d'un stimulus, ces pores dits de « perméabilité de transition » (PT) s'ouvrent et entraînent la libération dans le cytosol de molécules apoptogènes tels que le cytochrome c ainsi que le facteur apoptotique indépendant des caspases AIF (Apoptosis-Inducing Factor). Le cytochrome c se lie à la pro-caspase 9 et son cofacteur Apaf-1 pour former un complexe macromoléculaire : l'apoptosome (figure 13).

La libération du contenu mitochondrial est sous le contrôle de membres de la famille Bcl-2. Bcl-2 est capable de bloquer la sortie du cytochrome c (Kluck et coll., 1997 ; Vander-Heiden et coll., 1997 ; Yang et coll., 1997) contrairement à Bax qui l'induit (Jurgensmeier et coll., 1998).

La voie des caspases et la voie mitochondriale ne sont pas des voies totalement indépendantes. En effet, Bid est un pro-apoptotique qui, lorsqu'il est clivé par la caspase 8, permet la libération de cytochrome c (Figure 13) (Li et coll., 1998 ; Luo et coll., 1998).

Le rôle important de la mitochondrie au cours de l'apoptose des cellules ciliées par une surexposition au bruit a été confirmé récemment par une étude utilisant des inhibiteurs de la production énergétique mitochondriale (l'acide 3-nitropropionique, un inhibiteur irréversible de la succinate dehydrogenase (SDH)) (Hu et coll., 2008).

- la voie du réticulum endoplasmique

Le mécanisme par lequel le réticulum endoplasmique pouvait être lié à l'activation des caspases est resté pendant longtemps un mystère jusqu'à la caractérisation de la caspase 12 par Nakagawa et coll. (Nakagawa et coll., 2000). La caspase 12 est spécifique de la voie du réticulum endoplasmique. La figure 14 présente les voies de signalisation impliquant le réticulum endoplasmique. Sous l'effet d'un stress au niveau du réticulum endoplasmique, la concentration intracellulaire en calcium augmente. Cette augmentation activerait également les calpaïnes, qui, une fois activées, vont lyser des protéines et induire la mort cellulaire (Chan et Mattson, 1999 ; Sorimachi et coll., 1997). Des études ont montré qu'un traumatisme acoustique conduit à une augmentation du calcium intracellulaire (Fridberger et coll., 1998) et provoque une augmentation de l'activité des calpaïnes in vivo (Wang et coll., 1999b).

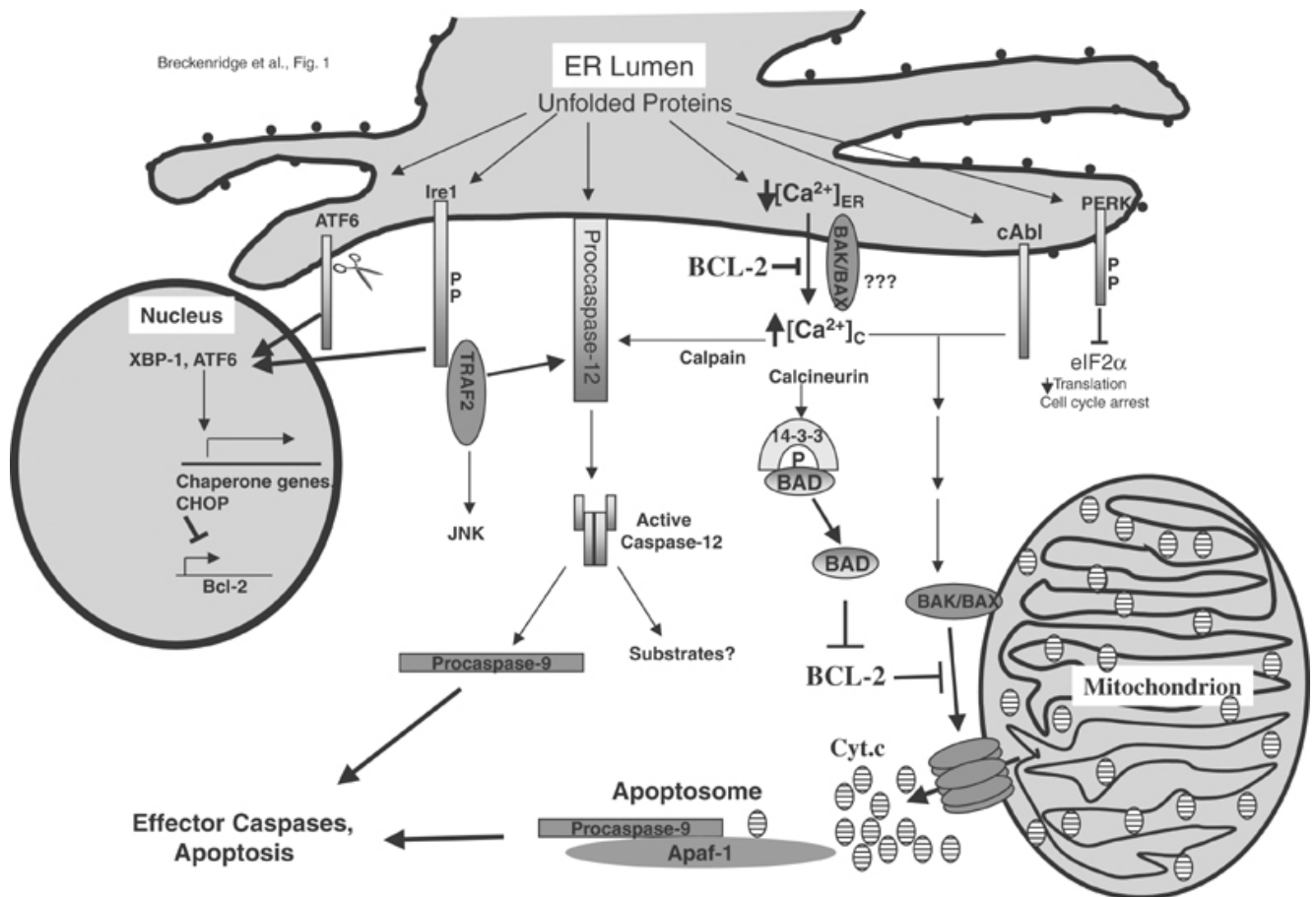


Figure 13 : Voie du réticulum endoplasmique. (D'après Breckendridge et coll., 2003)

- voie indépendante des caspases

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des caspases a permis de montrer l'existence de la mort cellulaire indépendante des caspases. La surexpression de la protéine Bax (protéine pro-apoptotique qui a pour cible les pores des mitochondries) conduit généralement à l'activation des caspases et à la mort cellulaire. L'inhibition des caspases par un inhibiteur synthétique, le z-VAD-fmk ne bloque pas la mort cellulaire induite par Bax (Xiang et coll., 1996). Un des acteurs moléculaires essentiel de l'apoptose indépendante des caspases est la protéine AIF (Apoptosis Inducing Factor). Il s'agit d'une molécule libérée par la mitochondrie. AIF possède à la fois une fonction

oxydo-réductase et une fonction apoptotique. Sous l'effet d'un stimulus apoptotique, AIF est « transloqué » vers le cytosol puis dans le noyau où il conduit à une condensation partielle de la chromatine et une fragmentation de l'ADN en fragments de 50 kpb (plus grands que ceux résultant d'une apoptose dépendante des caspases).

La connaissance de la physiopathologie du traumatisme sonore a permis de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de préserver la fonctionnalité des cellules sensorielles auditives ainsi que leur survie. Ainsi, l'état actuel de la recherche concernant la thérapeutique du traumatisme sonore fait l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE 3 : STRATEGIES THERAPEUTIQUES DU TRAUMATISME SONORE

D'un traitement classique global....

Bien que le traumatisme sonore ait été bien étudié durant ces dernières années, la seule mesure préventive efficace contre les pertes auditives reste le port de protections auditives en milieu bruyant. En France, le traitement recommandé après un traumatisme sonore aigu consiste à placer le malade dans un environnement silencieux et administrer des corticoïdes par voie systémique dans le cadre d'une hospitalisation (1,5 mg/kg de méthylprednisolone par jour pendant 6 jours), souvent associée à des substances vasodilatatrices (Vastarel[®], Tanakan[®]), parfois à une oxygénothérapie hyperbare et/ou à une hémodilution normovolémique (Le Mouel et coll., 1981 ; Cudennec et coll., 1983 ; Vincey et coll., 1988).

...A de nouvelles stratégies thérapeutiques variées et ciblées

La connaissance plus précise des mécanismes physiopathologiques du traumatisme sonore a conduit, depuis quelques années, à la recherche de stratégies thérapeutiques plus efficaces et plus ciblées. Le but de ce chapitre est d'exposer la diversité des stratégies thérapeutiques du traumatisme sonore ayant fait l'objet d'études, en général chez l'animal, parfois chez l'Homme.

1. Efficacité des anti-inflammatoires, intérêt des corticoïdes

Un traumatisme sonore conduit à des lésions mécaniques, hypoxiques et ischémiques. Plusieurs études ont montré l'existence d'une réaction inflammatoire intra-cochléaire (Tornabene et coll., 2006, Hirose et coll., 2005). Cette réaction implique le recrutement de cellules leucocytaires dans la circulation vers l'oreille interne et provoque l'expression de cytokines pro-inflammatoires par les fibrocytes du ligament spiral (Sato et coll., 2002). Quelques années auparavant, Lamm et Arnold (1998-1999) avaient montré l'intérêt de l'administration de substances anti-inflammatoires (prednisolone) chez des cobayes après traumatisme sonore (Lamm et Arnold, 1998 ; Lamm et Arnold, 1999). L'efficacité thérapeutique des glucocorticoïdes a été particulièrement étudiée dans différents modèles de traumatisme sonore.

Efficacité des corticoïdes par voie systémique

L'idée d'un traitement des lésions auditives par les glucocorticoïdes a débuté à la fin des années 70 lorsque McCabe (1979) a décrit les pertes auditives d'origine auto-immune. Durant les dernières années, l'efficacité des corticoïdes a été testée chez l'animal essentiellement dans le cadre d'un traitement par voie systémique. Pour que le traitement soit efficace, la substance thérapeutique doit être capable de traverser la barrière hémato-cochléaire. Les corticoïdes sont capables de traverser cette barrière lorsqu'ils sont administrés par voie orale ou par voie intraveineuse (Parnes et coll., 1999). Le tableau 3 présente les quatre principales études évaluant l'efficacité des corticoïdes par voie systémique après traumatisme sonore. Ces études confirment que les corticoïdes protègent l'oreille interne des pertes auditives après une exposition à un bruit continu traumatisant.

Cependant, Takahashi et coll. (1996) n'observent pas de différence significative entre les groupes traités et témoins lorsque ceux-ci ont été exposés à un niveau sonore plus élevé (115 et 120 dB SPL). L'efficacité des corticoïdes est dose-dépendante (Lamm et Arnold, 1998). Niedermeyer et coll. (2003) ont évalué la concentration de cortisol intracochléaire chez l'homme après injection de 125 ou 250 mg de prednisolone. Ils observent une augmentation significative uniquement pour la plus forte dose. Tobita et coll. (2002) ont étudié la perméabilité des barrières hémato-encéphalique et hémato-cochléaire pour la prednisolone. Ils observent que la barrière hémato-cochléaire est beaucoup plus perméable que la barrière hémato-encéphalique mais la concentration injectée était très élevée (100 mg/kg). L'utilisation de fortes concentrations de corticoïdes par voie systémique entraîne des effets secondaires. Bien que le traitement le plus couramment utilisé à ce jour soit l'administration systémique de corticoïdes, les oto-rhyno-laryngologistes connaissent bien les complications secondaires à court ou long terme de cette voie d'administration. C'est ainsi que depuis quelques années, les chercheurs ont recours à d'autres méthodes d'administration directe, en particulier la voie intra-cochléaire, qui permet d'utiliser des concentrations moindres et d'éviter les effets secondaires.

Référence bibliographique	Type de bruit traumatisant	Substance et voie d'administration	Modèle expérimental	Efficacité du traitement
<i>Henry et coll., 1992</i>	Bruit à large spectre (6000 Hz à 30000 Hz) à 120 dB pendant 5 min	Méthylprednisolone 40 mg/kg voie intramusculaire	souris	Souris traitées : moins de pertes auditives que les souris témoins
<i>Takahashi et coll., 1996</i>	Son pur 2000 Hz à 110 dB pendant 10 min	Méthylprednisolone 6 mg/kg par jour pendant 7 jours par voie intrapéritonéale	cobaye	Amélioration de la récupération auditive
<i>Lamm et Arnold, 1998</i>	Son large spectre à 106 dB pendant 30 min	Prednisolone 2,5 mg ou 25 mg voie intraveineuse	cobaye	2,5 mg : n'améliore que les PA du nerf auditif 25 mg : récupération complète des PA du nerf auditif et PE du tronc cérébral + récupération partielle des PMC.
<i>D'Aldin et coll., 1999</i>	Bruit continu pendant 20 min centré a 8000 Hz à 129 dB	Méthylprednisolone 20 mg/kg, voie intramusculaire	cobaye	Amélioration des seuils auditifs

Tableau 3 : Quatre études montrant l'efficacité des corticoïdes après traumatisme sonore.
PA : potentiel d'action, PE : potentiel évoqué, PMC : Potentiel microphonique cochléaire.

Une voie d'administration prometteuse, la voie intra-cochléaire....

Très récemment, Swan et coll. ont réalisé une revue intéressante regroupant l'ensemble des connaissances actuelles qui démontraient l'intérêt d'une administration des traitements par voie locale (Swan. et coll., 2008). L'administration peut consister en un dépôt de la substance sur la fenêtre ronde ou en une perfusion directe après perforation de la paroi osseuse (sur modèle animal uniquement). La voie locale permet de contrer la barrière hémato-cochléaire pour les substances qui sont incapables de la traverser et permet une action ciblée de l'agent thérapeutique. Des expérimentations chez les animaux ont permis d'observer que l'administration locale de corticoïdes entraîne des concentrations plus élevées dans l'oreille interne comparée à une administration systémique. Selon Bachmann et coll. (2001), la concentration de glucocorticoïdes est approximativement cent fois plus élevée dans l'oreille interne après une administration locale (dépôt sur la fenêtre ronde) comparée à une administration systémique. Parnes et coll. (1999) ont confirmé que la voie intra-tympanique permet de plus fortes concentrations dans l'oreille interne que la voie systémique. Chandrasekhar et coll. (2000) ont comparé également les concentrations périlymphatique et plasmatique après une administration intraveineuse ou intra-tympanique (injection transtympanique) de dexaméthasone. Ils ont mesuré des concentrations deux fois plus élevées dans la périlymphe pour l'administration intra-tympanique.

Les chercheurs ont ainsi testé l'efficacité des glucocorticoïdes chez l'animal via cette voie d'administration. L'administration préventive de dexaméthasone par voie intra-cochléaire permet d'atténuer les pertes auditives consécutives à un traumatisme sonore (120 dB SPL, 4 kHz, pendant 24 h) chez le cobaye (Takemura et coll., 2004).

Malgré l'utilisation des corticoïdes en tant que substances thérapeutiques du traumatisme sonore, la compréhension des mécanismes de signalisation dans l'oreille interne reste limitée.

Mécanisme d'action

Au fil des années, les mécanismes par lesquels les corticoïdes diminuent les lésions auditives après traumatisme sonore ont suscité un grand intérêt dans la communauté scientifique. Les chercheurs se sont intéressés en particulier aux récepteurs aux glucocorticoïdes. Chez l'Homme, la présence de récepteurs aux glucocorticoïdes a été mise en évidence dans les tissus vestibulaires et cochléaires et particulièrement dans le ligament spiral (Rarey et Curtis, 1996). Le récepteur aux glucocorticoïdes, qui fait partie de la super famille des récepteurs nucléaires (Mangelsdorf et coll., 1995), est un facteur de transcription qui régule l'expression de plusieurs gènes. Ainsi, les glucocorticoïdes se lient à leurs récepteurs présents dans le cytoplasme sous forme inactive grâce à une protéine chaperonne (protéine HSP, heat shock protein). Sous l'action de cette liaison, le récepteur se détache de la protéine chaperonne et se dimérise pour se diriger dans le noyau. A ce niveau, le ligand lié à son récepteur se fixe sur un site précis de l'ADN pour réguler l'expression de gènes spécifiques et ainsi conduire à une réponse biologique ciblée (Beato et coll., 1995). Les récepteurs aux glucocorticoïdes sont ainsi capables de moduler la fonction de certains facteurs de transcription tels que AP-1 (Mori et coll., 1997) et NF- κ B (De Bosscher et coll., 2000). NF- κ B ou protéine Rel est le facteur de transcription le plus important qui induit directement l'expression de cytokines pro ou anti-inflammatoires. Dans son état inactif, NF- κ B est présent dans le cytoplasme lié à une protéine inhibitrice, I κ B. Après activation, I κ B se phosphoryle et se dégrade, laissant alors la possibilité à

NF- κ B de se diriger vers le noyau pour réguler l'expression des gènes. Les gènes contrôlés par le NF- κ B sont les gènes codant pour des cytokines et leurs récepteurs (Xiao et coll., 2005), des facteurs de croissance (Au et coll., 2005), ou des gènes de réponse au stress (Morgan et coll., 2002 ; Zhou et coll., 2003). Actuellement, le rôle de NF- κ B dans la cochlée n'est pas encore clair. Il peut avoir un rôle protecteur après traumatisme sonore (Tahera et coll., 2006) ou pro-inflammatoire (Masuda et coll., 2006). Cette diversité d'action du complexe récepteur aux glucocorticoïdes/NF- κ B peut s'expliquer par leur liaison avec une concentration plus ou moins élevée de glucocorticoïdes circulants (Hansson et coll., 2000 ; Schaaf et coll., 1997). De manière physiologique, les glucocorticoïdes circulants sont augmentés après un traumatisme sonore (Rarey et coll., 1995), il existe donc un système de protection endogène. Wang et Liberman ont montré que, pendant la période durant laquelle le taux de corticoïdes est élevé, les animaux sont moins susceptibles aux pertes auditives dues au traumatisme sonore (Wang et Liberman, 2002). De plus, bloquer les récepteurs aux glucocorticoïdes augmente les pertes auditives après traumatisme sonore (Mori et coll., 2004). Enfin, l'effet protecteur de la dexaméthasone serait lié en partie à ses capacités à augmenter le flux sanguin dans l'oreille interne (Shirwany et coll., 1998). Cette protection résulte d'une modification rapide des canaux calciques et d'une mobilisation du calcium comme décrit dans d'autres systèmes biologiques. Selon le type cellulaire, les corticoïdes peuvent inhiber (He et coll., 2003) ou stimuler (Zhou et coll., 2000 ; Takahashi et coll., 2002) l'entrée de calcium intracellulaire.

Et chez l'Homme ?

Chez l'Homme, l'efficacité des corticoïdes après un traumatisme sonore par bruit d'arme (milieu militaire) avait été démontrée très tôt dans une étude menée par Suc et Asperge

(1988). Sur 213 sujets, 60% des sujets recevant une corticothérapie par voie systémique ont présenté une disparition des acouphènes contre 40% pour les sujets non traités. Plus récemment, une étude a été menée chez des groupes de soldats soumis à un traumatisme sonore aigu (fusil G3). Cette étude a montré la nécessité d'un traitement rapide utilisant des corticoïdes. 69 % des soldats traités ont présenté une amélioration de la récupération auditive mais le groupe qui a présenté les meilleurs résultats était celui qui avait été traité dans la première heure après le traumatisme sonore (comparativement à un traitement plus d'une heure après ou plus de 24 heures après le traumatisme) (Psillas et coll., 2008). Concernant l'administration locale, il n'existe que peu d'études réalisées chez l'Homme. Cependant, des études ont été effectuées chez des patients atteints de surdité brusque ou de la maladie de Ménière. Dans une étude où 10 sujets atteints de surdité brusque ont été traités de façon locale avec la dexaméthasone, 80 % ont vu leur audition améliorée (Chandrasekhar, 2001). La méthylprednisolone ou la dexaméthasone administrée par voie locale sont également efficaces chez des patients atteints de la même pathologie (Plontke et coll., 2005 ; Kopke et coll., 2001).

La corticothérapie par voie locale chez l'Homme après un traumatisme sonore reste encore un challenge. Néanmoins, de nouvelles méthodes d'administration intra-cochléaire chez l'Homme se développent. Il existe actuellement trois méthodes d'administration locale : l'injection intra-tympanique via une seringue ou un tube à pression, l'utilisation d'un microcathéter dans la fenêtre ronde et l'utilisation d'une « micro-éponge » ou MicroWick (Silverstein, 1999 ; Seidman et Vivek, 2004). L'illustration du microcathéter et du MicroWick est présentée figure 15. Les résultats de cette voie d'administration sont très prometteurs. Les patients pour qui une administration systémique est contre-indiquée (par exemple, les diabétiques) peuvent être traités par voie intra-cochléaire. D'autres méthodes d'administration intra-cochléaire sont en cours de développement.

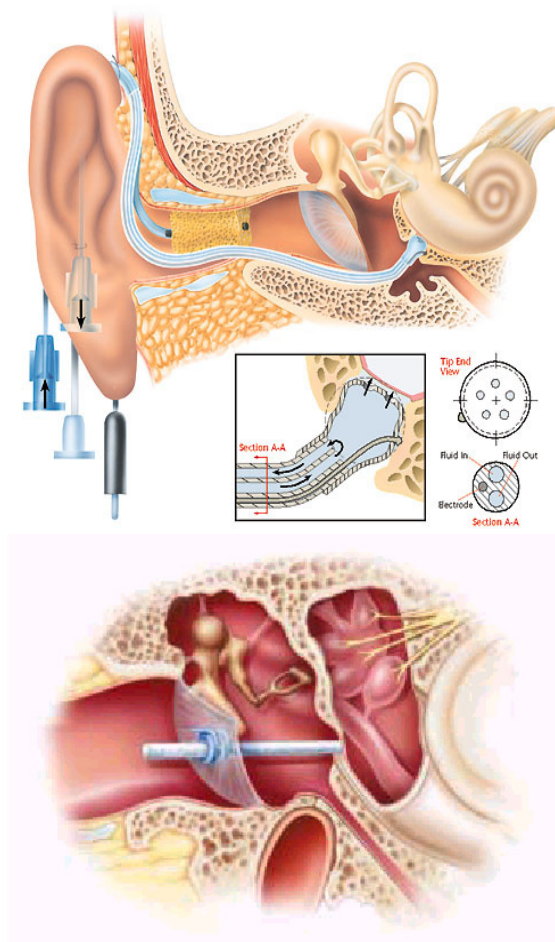


Figure 14 : Deux techniques d'administration locale chez l'homme, le microcathéter de Silverstein (en haut), qui peut être relié à une pompe externe et la « micro-éponge » transtympanique (MicroWick) (en bas), imbibée au niveau du conduit externe par le patient lui-même.

2. Efficacité des anti-oxydants

Un traumatisme sonore peut induire la libération de radicaux libres et donc un stress oxydant. Les substances anti-oxydantes peuvent donc représenter un outil thérapeutique du traumatisme sonore. Dans l'organisme, il existe des systèmes antioxydants endogènes qui se chargent d'éliminer les radicaux libres tels que des systèmes enzymatiques, des protéines non enzymatiques, des molécules hydrosolubles, et des anti-oxydants d'origine alimentaire. Ces systèmes sont présentés dans le tableau 4.

Nature de l'anti-oxydant	Substances
<i>Anti-oxydants enzymatiques</i>	<i>Superoxyde dismutase (SOD) Catalase (CAT) Glutathion peroxydase (GPx) Glutathion-S-transférase Glutathion réductase</i>
<i>Protéines anti-oxydantes non enzymatiques</i>	<i>Ferritine Transferrine Céruleoplasmine Albumine métallothioneines</i>
<i>Molécules hydrosolubles anti-oxydantes</i>	<i>Glutathion Acide urique Bilirubine Coenzyme Q Mélanines Acide lipoïque</i>
<i>Anti-oxydants d'origine alimentaire</i>	<i>Vitamines E, C, B2, B3, B9 Caroténoïdes Zinc Sélénium Polyphénols</i>

Tableau 4 : Les systèmes anti-oxydants

Le glutathion, un système anti-oxydant primaire, est retrouvé dans la strie vasculaire et dans le ligament spiral (Usami et coll., 1996). Yamasoba et coll. (1998) montrent que des animaux présentant une production endogène de glutathion faible sont plus susceptibles au traumatisme sonore. En administrant un inhibiteur de la synthèse de glutathion (le L-Buthionine -[S,R]-sulfoximide ou BSO), Yamasoba et coll. (1998) montrent que les animaux déficitaires en glutathion endogène sont plus susceptibles au traumatisme sonore. Inversement, des animaux traités par le 2-oxothiazolidine-4-carboxylate (OTC), une substance qui permet la restauration rapide du glutathion, sont moins susceptibles à un traumatisme sonore (Yamasoba et coll., 1998). L'importance des anti-oxydants endogènes a été mise en évidence par des expériences de manipulation génétique dans lesquelles la

protection endogène a été réduite par une délétion de la Cu-Zn superoxyde dismutase (Sod1) (Ohlemiller et coll., 1999 ; Mc Fadden et coll., 2001) ou de la glutathione peroxidase (Gpx1) (Ohlemiller et coll., 2000).

De nombreux chercheurs se sont donc intéressés à une thérapeutique du traumatisme sonore basée sur le glutathion. La N-acétylcystéine (NAC), un précurseur du glutathion et « piègeur » des radicaux libres, réduit les pertes auditives permanentes chez des cobayes exposés à un bruit (Ohinata et coll, 2003, Duan et coll., 2004) et chez des chinchillas (délivré en association avec le salicylate) (Kopke et coll, 2000). Cependant, le NAC n'a pas d'effets sur les pertes auditives temporaires chez l'homme (Kramer et coll., 2006) et chez les rongeurs (Kopke et coll, 2000 ; Duan et coll, 2004). La cystéine disponible dans la cellule est un marqueur du niveau de glutathion endogène. La cystéine pouvant dériver de la méthionine, l'utilisation d'un pré-traitement avec la D-méthionine a donc été une stratégie thérapeutique alternative. La D-méthionine permet de réduire les pertes auditives permanentes mais pas les pertes auditives temporaires (Kopke et coll., 2002). L'ebesen est une substance qui mime l'action du glutathion et qui réduit donc la formation de radicaux libres (Noguchi et coll., 1992). Contrairement à un traitement utilisant la NAC et la D-méthionine, un pré-traitement utilisant l'ebesen réduit aussi bien les pertes auditives temporaires que permanentes (Pourbakht et Yamasoba, 2003, Lynch et coll., 2004 ; Lynch et Kil, 2005 ; Yamasoba et coll., 2005). Bien que les comparaisons entre ces différentes études soient difficiles de par la variabilité des doses utilisées, la durée du traitement, le modèle de bruit et l'espèce utilisée, il est admis que ces agents thérapeutiques qui augmentent la production de glutathion endogène apportent une protection auditive partielle. Cette protection incomplète est due au fait que les « piègeurs » hydroxyles ne sont efficaces que partiellement dans l'inhibition de la peroxydation lipidique car ils entrent en compétition avec les groupes hydroxyles libres mais ne passent pas la membrane

lipidique pour piéger ces mêmes groupes à l'intérieur de la cellule (Halliwell et Gutteridge, 1998).

L'administration d'anti-oxydants exogènes a été testée également comme traitement potentiel du traumatisme sonore. Les anti-oxydants réduisent de façon efficace la mort des cellules sensorielles ainsi que les pertes auditives. Ceci a bien été démontré par de nombreuses études menées chez l'animal (Tableau 5).

Auteurs	Substance testée	Type de bruit	Résultats
<i>Ohinata et coll, 2000</i>	Glutathion monoethylester (GSHE) en prophylaxie et post-traumatisme	115 dB, 4 kHz pendant 5h	Limite les dommages auditifs, efficace en prophylaxie
<i>Kopke et coll, 2002</i>	GSHE en prophylaxie et après traumatisme	105 dB, 4 kHz pendant 6h	Réduit les dommages auditifs
<i>Hight et coll., 2003</i>	GSHE en prophylaxie	Bruit impulsionnel 145 dB ou continu 4 kHz 105 dB	Protection auditive surtout pour le bruit impulsionnel
<i>Miller et coll, 2003</i>	GSHE en prophylaxie	115 dB, 4 kHz pendant 5h	Limite les dégâts vasculaires
<i>Seidman et coll., 2003</i>	Resveratrol en prophylaxie et post-traumatisme	105 dB, de 4.5 à 9 kHz pendant 24h	Diminution des seuils
<i>Seidman et coll., 1993</i>	Allopurinol en post-traumatisme	90 dB pendant 60h	Diminution des seuils
<i>Cassandro et coll., 2003</i>	Allopurinol en prophylaxie	125 dB, 2-3 kHz, 4 fois/s pendant 1.8h	Diminution des seuils
<i>Seidman et coll., 1993</i>	Superoxide dismutase-polyethylene glycol en post-traumatisme	90 dB pendant 60h	Diminution des seuils
<i>Quirk et coll., 1994</i>	U74389F	90 dB pendant 60h	Diminution des seuils
<i>Hu et coll., 1997</i>	R-phenylisopropyladenosine (R-PIA) en post-traumatisme	105 dB, 4 kHz pendant 4h	Diminution des seuils et accélération de la récupération
<i>Hight et coll., 2003</i>	R-PIA+ GSHE en prophylaxie	Bruit impulsionnel 145 dB ou continu 4 kHz 105dB	Protection pour les 2 types de bruit
<i>Fetoni et coll., 2009</i>	Coenzyme Q10 en post traumatisme	120 dB, 6 kHz, pendant 1h	Diminue l'apoptose et les dérèglements mitochondriaux
<i>Duan et coll., 2006</i>	Caroverine en post traumatisme	Bruit impulsionnel 160 dB, 0.33/s pendant 300 µs	Protection auditive
<i>Kil et coll., 2007</i>	Ebselen en post traumatisme	113dB, 4-16 kHz pendant 4h	Réduit la perte des cellules auditives
<i>Gao et coll., 2009</i>	Edaravone en injection intra-tympanique post traumatisme	125 dB pendant 2h	Diminution du taux de radicaux libres dans la cochlée

Tableau 5 : Efficacité d'agents anti-oxydants exogènes après traumatisme sonore

Les anti-oxydants d'origine alimentaire ont été testés également. Cependant, il a été montré que la supplémentation devait être administrée longtemps avant l'exposition au bruit. En effet, un pré-traitement de vitamine C administré 35 jours avant le traumatisme diminue significativement les pertes auditives et la mort des cellules sensorielles (Mc Fadden et coll., 2005) alors qu'un traitement administré 48 heures avant le traumatisme n'empêche pas la mort cellulaire induite par le bruit (Branis et Burda, 1988).

Tout comme les traitements basés sur le glutathion, les traitements utilisant les anti-oxydants d'origine alimentaire ne donnent qu'une efficacité partielle. Yamasoba et coll. (2004) ont démontré la présence d'un pic de radicaux libres jusqu'à 7 à 10 jours après l'exposition sonore. Ces résultats suggèrent la possibilité d'utiliser les anti-oxydants en traitement tardif. Certaines études qui avaient mesuré l'efficacité de l'utilisation d'anti-oxydants post-traumatisme ont présenté des résultats décevants. Par exemple, Kopke et coll. (2000) ont testé l'efficacité de l'association N-Acétyl-cystéine (NAC) et salicylate administrée juste après le traumatisme, ils ont obtenu une faible mais significative diminution des pertes auditives mais aucune réduction au niveau des pertes cellulaires. Cependant des recherches plus récentes ont apporté de nouvelles données. L'efficacité du salicylate et de la vitamine E a été testée selon que l'administration a eu lieu avant ou après l'exposition au bruit. Le traitement administré avant le traumatisme a été le plus efficace dans la prévention des pertes auditives et de la mort cellulaire, cependant le traitement administré 24 heures après le traumatisme a présenté des résultats qui n'étaient pas différents statistiquement du pré-traitement. Ce même traitement administré trois jours après le traumatisme réduit également les pertes auditives et la mort cellulaire de manière significative. Par contre, lorsque l'administration a lieu 5 jours après, celle-ci n'est pas efficace, ce qui suggère une fenêtre thérapeutique de trois jours après traumatisme (Yamashita et coll., 2005a). Il reste difficile de comparer les résultats obtenus avec les

différents types d'anti-oxydant car les paramètres sont trop variables : dose administrée, durée, espèces utilisées, durée et niveau de l'exposition au bruit. Cependant, il semble bien que les anti-oxydants soient capables d'atténuer les pertes auditives et les pertes cellulaires après un traumatisme sonore. Des études pré-cliniques ont confirmé la non-toxicité d'un grand nombre de ces agents et certains d'entre eux ont été testés chez l'homme avec peu d'effets secondaires.

3. Efficacité des vasodilatateurs

Une exposition sonore de forte intensité induit une diminution du flux sanguin dans la cochlée (Perlman et Kimura, 1962 ; Lipscomp et Roettger, 1973, Thorne et Nutall, 1987 ; Miller et coll., 2006). Celle-ci est une conséquence directe d'une vasoconstriction induite par le bruit (Quirk et coll., 1992 ; Quirk et Seidman, 1995). Les auteurs ont émis l'hypothèse que des agents qui réduisent la vasoconstriction ou ayant des effets vasodilatateurs pourraient diminuer les pertes auditives consécutives au bruit. La betahistine et l'hydroxyéthyl starch (HES) 70 ou HES 200 permettent une diminution des pertes auditives (Lamm et Arnorld, 2000). L'HES se révèle particulièrement efficace en association avec la prednisolone et la betahistine a permis une diminution de l'hypoxie cochléaire ainsi qu'une récupération partielle des pertes auditives (Lamm et Arnold, 1999). Le magnésium est également une substance capable d'agir contre la diminution du flux sanguin (Altura et coll., 1992 ; Haupt et Scheibe, 2002).

4. Efficacité des facteurs de croissance

Les facteurs neurotrophiques (NTF) piègent les radicaux libres, bloquent les voies de mort cellulaire, et modulent l'homéostasie calcique, chacun de ces processus atténuant les pertes auditives induites par le bruit. La libération de radicaux libres stimule la formation du facteur neurotrophique cérébral BDNF (Brain-Derived Neurotropic Factor) (Wang et coll., 2006). Or, le BDNF et la neurotrophine-3 (NT3) modulent l'homéostasie calcique (Nakao et coll., 1995). De plus, le facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF ou FGF2) régule la concentration de calcium intracellulaire et le métabolisme énergétique mitochondrial (El Idrissi et Trenkner, 1999). Ainsi, les NTF ont été utilisés pour restaurer l'homéostasie calcique dans la maladie d'Alzheimer (Holscher et coll., 2005) et le diabète (Huang et coll., 2002). Les NTF peuvent donc représenter des outils thérapeutiques pour protéger la cochlée des radicaux libres et agir sur l'homéostasie calcique cochléaire après traumatisme sonore. L'administration de NTF exogènes dans la cochlée protège de la mort cellulaire consécutive au traumatisme sonore. Ainsi, le FGF2 limite la mort cellulaire et les pertes auditives chez le cobaye (Zhai et coll., 2004). Le facteur de croissance fibroblastique acide (aFGF ou FGF1) est efficace de la même manière. Délivré localement à l'aide d'une micropompe osmotique, il réduit les pertes auditives permanentes chez le cobaye (bien que les pertes temporaires ne soient pas réduites comme il avait été observé pour les agents anti-oxydants) (Sugahara et coll., 2001). Le facteur neurotrophique d'origine gliale (GDNF) et le NT3 protègent des dommages induits par le bruit chez le cobaye lorsqu'ils sont administrés localement de façon chronique à l'aide d'une micropompe osmotique (Ylikoski et coll., 1998, Yamasoba et coll., 1999 ; Shoji et coll., 2000). Si le BDNF et, dans certaines études, les FGF1 et FGF2 (Yamasoba et coll., 2001) ne réduisent pas les dommages induits par le bruit, il y aurait une notion de spécificité selon le facteur de

croissance testé. Ceci serait expliqué par la présence de récepteurs au NTF différents dans les cellules ciliées (Ylikoski et coll., 1993 ; Pirvola et coll., 1997).

5. Efficacité du Magnésium

Il y a plusieurs années, les chercheurs et cliniciens ont démontré l'influence du magnésium dans la récupération auditive après traumatisme sonore. Les pertes auditives après traumatisme sonore chez le cobaye sont diminuées avec l'augmentation de la concentration en magnésium dans l'eau de boisson (le taux de magnésium dans la nourriture étant faible et constant) (Ising et coll., 1982). Les mêmes résultats ont été démontrés chez le rat (Joachims et coll., 1983). L'augmentation des pertes auditives après traumatisme sonore en corrélation avec une déficience en magnésium a également été montrée chez l'Homme (Joachims et coll., 1987). La magnésémie chez l'Homme est donc un facteur déterminant de la susceptibilité au traumatisme sonore.

Le magnésium, un bon candidat pour la thérapeutique du traumatisme sonore

Depuis les dernières années, les expérimentations de magnésothérapie ont été multipliées. Cet engouement s'explique par le fait que le magnésium, lorsqu'il est utilisé à bonne dose, est non toxique, ne présente pas d'effet secondaire et ne présente que peu de contre-indications (Ebel et Günther, 1980). Le magnésium est donc le candidat idéal pour des essais cliniques. Scheibe et coll. (2001) ont montré que l'administration de magnésium chez l'animal par voie systémique après un traumatisme sonore (une série d'impulsions : 167 dB, une fois par seconde pendant 38 min) réduit significativement les pertes auditives après 7 jours (Scheibe et coll., 2001). Les mêmes auteurs ont montré que ce traitement est

dose dépendant et plus efficace quand il est administré rapidement (Scheibe et coll., 2002). Les réductions des pertes auditives permanentes chez le cobaye, 7 jours après le traumatisme sonore, ont été confirmées par la technique des mesures de produits de distorsions qui reflètent l'activité des cellules ciliées externes (Haupt et coll., 2003). Dans notre laboratoire, la thérapie utilisant le magnésium pendant 7 jours chez le cobaye après un traumatisme sonore par bruit d'arme (FAMAS) a montré une efficacité à court terme (Sendowski et coll., 2006b).

Mécanisme d'action

Le magnésium est impliqué dans de nombreux processus biochimiques (il active approximativement 300 systèmes enzymatiques), participe à la synthèse des protéines, se trouve largement impliqué dans les échanges membranaires et la régulation du métabolisme énergétique cellulaire (James, 1992). S'agissant du traumatisme sonore, plusieurs hypothèses ont été envisagées. De par sa nature, le magnésium est un antagoniste calcique et s'oppose donc à une libération excessive tant au niveau des cellules ciliées qu'au niveau de la vascularisation cochléaire. Par ce mécanisme, le magnésium s'oppose au phénomène d'ischémie induit par le traumatisme sonore. Le débit sanguin cochléaire et la PO₂ périlymphatique chez des animaux exposés à un bruit traumatisant sont plus élevés lorsqu'ils sont supplémentés en magnésium (Haupt et Scheibe 2002). Plusieurs études démontrent qu'une élévation du magnésium extracellulaire provoque une vasodilatation dose-dépendante des artérioles, des sphincters précapillaires et des veinules. En outre, le magnésium diminue la constriction des microvaisseaux induite par les substances vasoconstrictrices (Altura et coll. 1992). Non seulement le magnésium s'oppose à l'ischémie, mais il préviendrait aussi les dommages cellulaires résultant d'une hypoxie

(König et coll. 2003). Cette action pourrait s'expliquer par l'effet protecteur du magnésium lors de stress oxydatif, comme il a été démontré sur les cellules cardiaques (Sharikabad et coll. 2001).

Un autre mode d'action de cet ion pourrait impliquer l'excitotoxicité glutamatergique. L'excitotoxicité glutamatergique au niveau de l'oreille interne implique des récepteurs au glutamate de type NMDA. Or, le canal NMDA est bloqué par des concentrations physiologiques d'ion Mg^{2+} extracellulaires (Nowak et coll. 1984, Dubray et coll. 1997). Enfin, l'hypoxie, le stress oxydatif ou l'excitotoxicité glutamatergique peuvent conduire à l'apoptose des cellules (Kannan et Jain, 2000). Une augmentation de la concentration de magnésium extracellulaire diminue l'apoptose induite par une hypoxie, en maintenant normal le rapport des protéines Bax/Bcl2, qui détermine l'orientation vers la survie ou la mort cellulaire (Ravishankar et coll. 2001). Toutes les actions connues du magnésium vont donc dans le sens d'une protection des cellules cochléaires.

Les nombreuses qualités du magnésium, à savoir son innocuité, son utilisation peu coûteuse, sa disponibilité, sa facilité d'utilisation, font de ce cation une substance très intéressante dans la thérapeutique du traumatisme sonore.

6. Une nouvelle stratégie : efficacité des anti-apoptotiques par voie locale

Le point de départ : dérèglement de l'homéostasie calcique

L'exposition au bruit entraîne une augmentation de la concentration calcique dans les dendrites afférentes et dans les cellules ciliées (Fridberger et Ulfendahl, 1996 ; Fridberger et coll., 1998). Cette élévation de calcium joue un rôle essentiel dans les déficits induits par

le traumatisme sonore puisque le blocage des canaux calciques peut limiter ces dommages (Heinrich et coll., 1999). Des modifications de la concentration calcique intracellulaire peuvent engendrer la mort cellulaire via la voie dépendante des calpaines (Kim et coll., 2002). Des augmentations du calcium intracellulaire provoquent l'activation de la calcineurine, une phosphatase dépendante du calcium, qui à son tour active le facteur de transcription NFAT (facteur nucléaire de transcription des lymphocytes T activés) ce qui initie la mort cellulaire par apoptose.

La mort cellulaire dépendante des calpaines : intérêt de la leupeptine.

Les calpaines, protéases dépendantes du calcium, sont activées lors d'un traumatisme sonore (Wang et coll., 1999a). En effet, dans une oreille témoin, l'activation des calpaines est minime alors qu'après un traumatisme sonore, l'expression des calpaines est importante dans les noyaux des cellules ciliées externes (Wang et coll., 1999a). La leupeptine est un puissant inhibiteur des calpaines. L'administration intra-cochléaire de leupeptine via une micropompe osmotique réduit significativement la mort cellulaire induite par le traumatisme sonore (Wang et coll., 1999b). L'inocuité de la leupeptine a été prouvée dans une étude menée sur 8 semaines chez le cobaye. La leupeptine (1mg/ml) a été administrée localement et a été sans conséquences néfastes sur le flux sanguin cochléaire, les seuils auditifs, et sur la mort cellulaire ; ce qui fait de cette substance un bon candidat pour des essais cliniques de traitement du traumatisme sonore (Tang et coll., 2001). De plus, l'administration intra-cochléaire de BN82270, un nouvel inhibiteur des calpaines et de la peroxydation lipidique, protège les cellules ciliées de la mort par apoptose après traumatisme sonore chez le cobaye (Pignol et coll., 2006).

La mort cellulaire dépendante de la calcineurine : intérêt des inhibiteurs spécifiques.

Lors de l'apoptose dépendante des calpaines, le clivage de la calcineurine est activé. Le traumatisme sonore entraîne une activation de la calcineurine, ceci a été démontré dans une étude d'immunomarquage de la calcineurine dans les cellules ciliées externes. Le marquage est très important juste après le traumatisme sonore puis diminue avec le temps (Minami et coll., 2004). Ces résultats indiquent la possibilité d'utiliser des inhibiteurs de l'activation de la calcineurine pour traiter le traumatisme sonore. Les inhibiteurs de la calcineurine, la cyclosporine A et le FK506, ont été testés. Ces substances ont été délivrées directement dans la cochlée à l'aide d'une micropompe osmotique pendant 14 jours chez le cobaye. Elles ont permis de réduire les pertes auditives ainsi que le mort cellulaire (Minami et coll., 2004). Récemment, une équipe a testé ces mêmes substances par la voie intrapéritonéale chez des souris et des cobayes. Les auteurs ont montré que l'injection réalisée juste avant l'exposition au bruit a permis la survie des cellules ciliées (Uemaetomari et coll., 2005). Cette étude est intéressante car cliniquement, l'administration systémique est plus facile à réaliser que l'administration intracochléaire. Cependant, l'intérêt reste à confirmer puisque les anti-apoptotiques administrés de manière systémique pourraient présenter des effets secondaires indésirables.

Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

L'utilisation de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 peut empêcher la mort cellulaire. La protéine Bcl-2 se lie à la calcineurine, empêchant ainsi la déphosphorylation du NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) et sa translocation (Shibasaki et McKeon,

1995 ; Shibasaki et coll., 1997 ; Srivastava et coll., 1999 ; Simuzu et coll., 2000 ; Biswas et coll., 2001 ; Erin et coll., 2003a).

Ce n'est que récemment que ces résultats ont été adaptés aux traumatismes sonores. Les traumatismes sonores induisant des ETS (Elévations Temporaires des Seuils auditifs) conduisent à une augmentation de l'expression de Bcl-XL, une protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2, dans les cellules ciliées externes. A contrario, les traumatismes sonores plus intenses, induisant des EPS (Elévations Permanentes des Seuils auditifs) et des pertes cellulaires, conduisent à l'augmentation de l'expression de Bak, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2, dans les cellules ciliées externes (Yamashita et coll., 2005b). Ces résultats sont confirmés par le fait qu'un traumatisme sonore diminue l'expression de la protéine Bcl-2 dans la cochlée (Niu et coll., 2003). Ces études démontrent l'implication des gènes Bcl-2 dans les traumatismes sonores.

La voie de mort cellulaire dépendante des caspases : intérêt des inhibiteurs.

Le nombre de caspases connues jouant un rôle dans la mort des cellules ciliées de l'oreille interne est beaucoup moins important que le nombre de caspases identifiées à ce jour. Il y a au moins 14 caspases connues, dont des caspases initiatrices (caspases 2, 8, 9 et 10) et des caspases effectrices (caspases 3, 5, 6 et 7) (Eldadah et Faden, 2000 ; Nicotera et coll., 2003 ; Eshraghi et Van de Water, 2006). La caspase 3 (Hu et coll., 2002 ; Nicotera et coll., 2003 ; Yang et coll., 2004 ; Hu et coll., 2006), la caspase 8 et la caspase 9 (Nicotera et coll., 2003) sont toutes activées dans l'oreille interne après traumatisme sonore. Les caspases activées jouent un rôle important dans la cascade de mort cellulaire.

L'utilisation d'inhibiteurs de caspases peut représenter une thérapeutique du traumatisme sonore d'autant plus qu'ils ont montré leur efficacité dans d'autres types de stress (Cheng

et coll., 1999 ; Nakagawa et coll., 2003 ; Zhang et coll., 2003 ; Corbacella et coll., 2004 ; Okuda et coll., 2005 ; Wei et coll., 2005). La perfusion intra-cochléaire d'un inhibiteur de la caspase 3 (Z-DEVD-FMK, 200 μ M) protège les cellules ciliées externes après traumatisme sonore par bruit continu chez le chinchilla (Hu et coll., 2002).

7. Autres stratégies thérapeutiques innovantes : thérapie génique et thérapie cellulaire

Les cellules sensorielles auditives étant incapables de se régénérer, les chercheurs se sont intéressés à de nouvelles stratégies basées sur leur restauration : la thérapie génique et l'utilisation de cellules souches.

La différenciation des cellules ciliées est sous la dépendance de l'expression d'un gène, le gène *Atoh1* (Birmingham et coll., 1999). Des expérimentations de culture d'épithélium sensoriel vestibulaire de souris ont montré que des cellules non sensorielles dans l'oreille interne sont capables de se différencier en cellules ciliées lorsque le gène *Atoh1* est introduit dans ces cellules (Woods et coll., 2004 ; Zheng et Gao, 2000). Les cellules de soutien sont donc capables de se différencier en présence de *Atoh1*. Ainsi des chercheurs ont développé des stratégies de transfection du gène *Atoh1* dans les cellules de soutien après perte des cellules ciliées induite par une toxicité aux aminoglycosides (Kawamoto et coll., 2003). Les animaux traités ont montré une régénération des cellules ciliées accompagnée d'une récupération auditive (Izumikawa et coll., 2005 ; Minoda et coll., 2004). Le gène a été également introduit dans d'autres cellules de soutien en dehors de l'organe de Corti créant le développement de cellules ciliées ectopiques. La technique mérite d'être affinée.

Une autre stratégie consiste en l'introduction d'une nouvelle population cellulaire. Les cellules souches sont utilisées dans cette approche thérapeutique (Parker et Cotanche, 2004).

Depuis quelques années, plusieurs groupes de chercheurs ont utilisé des cellules souches diverses dans le but de réparer le système auditif. Li et coll. (2003a) ont isolé et identifié des cellules souches intrinsèques de l'épithélium vestibulaire de la souris. Ces mêmes auteurs ont montré que des cellules embryonnaires de souris et des cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse sont capables d'exprimer des gènes spécifiques des cellules ciliées lorsqu'elles sont mises en culture (Jeon et coll., 2007 ; Li et coll., 2003b; Oshima et coll., 2007). Parker et coll. (2007) ont réalisé des transplantations de lignées de cellules souches nerveuses dans des cochlées de souris et de cobayes endommagées par le bruit. Ces expérimentations récentes ont montré que les quelques cellules infiltrées dans l'organe de Corti sont capables de se différencier en cellules cochléaires : cellules ciliées internes et externes et cellules de soutien. Cette technique pourrait être une approche thérapeutique intéressante pour réparer les tissus cochléaires humains endommagés par le bruit. Cependant, des expérimentations animales restent encore nécessaires afin d'améliorer cette technique d'approche (en particulier pouvoir cibler les transplantations dans la cochlée et mesurer le temps de survie de ces cellules).

8. Cible d'action des substances thérapeutiques du traumatisme sonore : synopsis

De nombreuses substances thérapeutiques ont été testées pour traiter les conséquences d'un traumatisme sonore. Les différentes stratégies thérapeutiques du traumatisme sonore sont loin d'être homogènes (type de substance, voie d'administration, dose administrée, modèle

animal, modèle de bruit...). Cependant, le progrès des recherches a permis depuis ces dernières années de comprendre les mécanismes physiopathologiques du traumatisme sonore et donc d'appréhender l'action de chaque outil thérapeutique. Ceci permet de réaliser un schéma physiopathologique global permettant de lier les substances thérapeutiques à un mécanisme. Ce schéma est présenté figure 15.

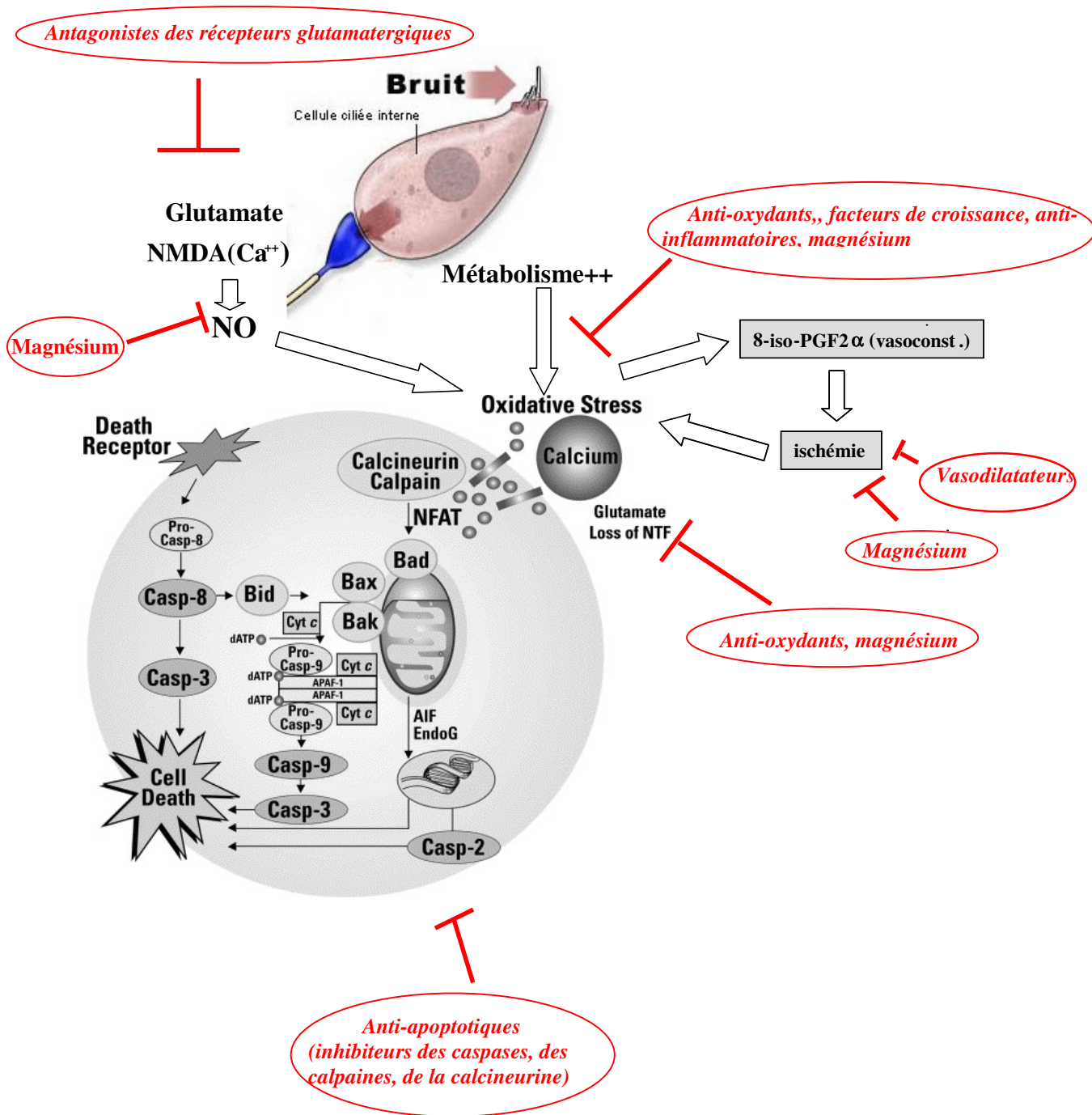


Figure 15 : Schéma synoptique de la physiopathologie du traumatisme sonore et des cibles d'action des substances thérapeutiques

Travail expérimental

INTRODUCTION

L'objectif principal de notre laboratoire est de comprendre la physiopathologie d'un traumatisme sonore par bruit d'arme et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Plusieurs voies de recherche sont mises en place afin de tester l'efficacité de nouvelles molécules ainsi que des nouvelles voies d'administration. Le modèle animal utilisé est le cobaye, animal de référence pour étudier la physiologie du système auditif. Le modèle de traumatisme sonore est l'exposition à trois tirs à blanc de FAMAS (Fusil d'Assaut de la Manufacture d'Armes de Saint-Etienne), ce qui représente un bruit impulsionnel d'une intensité de 170 dB SPL (pic).

Le travail de thèse s'est orienté selon plusieurs critères thérapeutiques : la voie d'administration, la durée du traitement, la nature de la substance thérapeutique. Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à la voie d'administration intra-cochléaire. Cette étape a pour but de mettre au point cette technique d'administration prometteuse chez l'animal en utilisant le traitement de référence (corticoïdes). Dans un second temps, le magnésium ayant montré une efficacité à court terme, nous avons testé le prolongement de sa durée d'administration. Enfin, la technique d'administration intra-cochléaire a été mise à profit afin de tester l'efficacité de substances anti-apoptotiques après traumatisme sonore par bruit d'arme.

Le travail expérimental se présente ainsi en trois parties :

1^{ère} PARTIE : Efficacité de l'administration intra-cochléaire de méthylprednisolone après traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye.

2^{ème} PARTIE : Efficacité de l'administration à long terme de magnésium après traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye.

3^{ème} PARTIE : Efficacité des anti-apoptotiques par voie locale chez le cobaye :

A- étude préliminaire : cinétique comparative de l'apoptose après traumatisme sonore par bruit continu versus bruit d'arme

B- efficacité de l'administration intra-cochléaire de deux molécules anti-apoptotiques : leupeptine et z-VAD-FMK.

1^{ère} PARTIE : Efficacité de l'administration intra-cochléaire de méthylprednisolone après traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye.

Cette expérimentation a été publiée dans la revue *Hearing Research* sous le titre « *Therapeutic efficacy of intra-cochlear administration of methylprednisolone after acoustic trauma caused by gunshot noise in guinea pigs* » ; Sendowski, I., **Abaamrane L.**, Raffin F., Cros A., Clarençon D. (*Hearing Research*, 2006, 221 : 119-127).

1. Introduction

En France, la conduite thérapeutique préconisée lors d'un traumatisme sonore aigu sévère consiste à administrer un corticostéroïde à forte dose (méthylprednisolone 1-2 mg/kg, IV pendant 5 jours), éventuellement associé à un vasodilatateur, une hyperoxygénothérapie hyperbare ou une hémodilution normovolémique. Cependant, l'efficacité d'un traitement stéroïdien après traumatisme sonore reste encore soumise à controverse. Plusieurs expérimentations sur modèle animal (pour lesquelles les conditions expérimentales sont strictement contrôlées) ont été réalisées par le passé afin de confirmer ou non l'intérêt de cette thérapeutique. Henry (1992) fut le premier à démontrer l'effet protecteur d'une administration de corticoïdes lors d'exposition à un bruit intense. Il administre à des souris, avant et après leur exposition à un bruit continu traumatisant, de la méthylprednisolone (MP) à forte dose (40 mg/kg i.m.) ou un placebo (NaCl). Les animaux traités préventivement par la MP présentent significativement moins de pertes auditives que les animaux contrôles. Cette efficacité préventive a été confirmée par Takemura et coll. (2004) avec la dexaméthasone (DEX). Dans son étude, il administre à des cobayes par voie intra-cochléaire, au moyen d'une minipompe osmotique, soit de la DEX soit de la périlymphe artificielle (PA). Quatre jours après l'implantation, les animaux sont traumatisés par un son

continu (120 dB SPL ; 4 kHz ; 24 h). Les potentiels évoqués auditifs et l'analyse histologique des cochlées réalisée en fin d'expérimentation confirment l'effet protecteur du corticoïde. De même, les corticoïdes endogènes modulent la sensibilité au traumatisme sonore. Ainsi, chez le rongeur, un stress de contention avant exposition au bruit (ce qui augmente physiologiquement le taux de corticostérone), limite les pertes auditives (Wang et Lieberman, 2002). Cependant, dans leur étude sur le cobaye, Kardilag et coll. (2002) n'ont pas retrouvé l'effet préventif de la MP (administrée par voie intramusculaire à la dose de 40 mg/kg, 24 heures avant l'exposition au bruit). Dans les études précédentes, les corticostéroïdes ont été administrés avant le traumatisme. Quelques expérimentations ont été réalisées pour étudier l'efficacité thérapeutique de ce type de traitement. Lam et Arnold (1998) ont injecté une forte dose de prédnisolone (25 mg) à des cobayes, après les avoir exposés à un bruit peu traumatisant (106 dB, 30 minutes). Ils s'aperçoivent alors que ce traitement accélère le retour à la normal du seuil auditif. La récupération est moindre lorsque la dose est plus faible (2,5 mg). Mais cette étude ne concerne qu'un effet à court terme. A plus long terme, nous citerons les résultats de Takahashi et coll. (1996). Ces auteurs exposent des cobayes à des bruits continus d'intensité variable (110, 115 et 120 dB SPL durant 20 minutes), puis les traitent durant une semaine par la MP (40 mg/kg, i.p.) ou une solution saline. Ils observent une différence significative uniquement dans le cas de l'exposition à 110 dB SPL. Pour les intensités plus élevées, ils n'observent pas de différence. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par d'Aldin et coll. (1999) qui montre qu'une administration de MP (20 mg/kg, i.p.) permet de diminuer les pertes auditives de cobayes exposés à un bruit continu traumatisant (129 dB SPL, 8 kHz, 20 minutes). Plus récemment, sur un modèle de traumatisme auditif par vibration, El-Hennawi et coll. (2005) ont démontré que l'administration trans-tympanique de MP,

immédiatement après le traumatisme, améliorait la récupération auditive et limitait les lésions cellulaires.

Depuis quelques années, on peut voir apparaître un nombre croissant d'études qui concernent l'administration locale (trans-tympanique ou intra-cochléaire) des médicaments. Cette voie d'administration permet d'obtenir de fortes concentrations du produit actif dans les liquides de l'oreille interne et donne, dans de nombreux domaines, des résultats très encourageants (cf. Doyle et coll. 2004 ; Jackson et Silverstein, 2002 ; pour des revues de question).

2. Objectif de l'étude

L'intérêt d'un traitement corticoïde administré par voie locale n'a jamais été étudié après traumatisme sonore sur modèle animal. L'objectif de notre étude est donc d'évaluer l'efficacité thérapeutique de la méthylprednisolone, administrée durant 7 jours par voie intra-cochléaire, après traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye.

3. Protocole général

Le protocole précis de l'expérimentation est détaillé en ANNEXE 2 (page 271).

Trente-deux cobayes (de souche Dunkin Hartley ; Charles Rivers France) ont été utilisés dans cette expérimentation. Ils présentaient tous un réflexe de Preyer normal. Le protocole de cette étude a reçu l'avis favorable du comité d'éthique animale du Centre de Recherches de Santé des Armées (autorisation n° 46/2003). Une étude préliminaire sur animal « sain » a été menée de façon à déterminer la concentration de MP utilisable sans effet sur

l'audition. Plusieurs concentrations en MP ont été testées : 200, 300, 500 et 1000 μM , ainsi que la périlymphe artificielle seule.

Une semaine avant l'expérimentation, les deux cochlées des animaux sont équipées d'une électrode d'enregistrement pour permettre le recueil du potentiel d'action composite (PAC, technique de l'électrocochléographie). De plus, un microcathéter, relié à une mini-pompe osmotique remplie de périlymphe artificielle, est inséré dans la rampe tympanique d'une des deux cochlées, l'autre n'étant pas implantée. Avant traumatisme sonore, les seuils d'apparition des PAC sont relevés. Seuls les animaux ayant des seuils auditifs équivalents à droite et à gauche, sont conservés pour la suite de l'expérimentation. La mini-pompe osmotique est remplacée par une nouvelle pompe contenant la méthylprednisolone. Le moment du remplacement est déterminé de telle sorte que, en tenant compte du débit de la minipompe, le traitement parvienne à la cochlée 1 heure après le traumatisme. Les animaux ainsi équipés, sont exposés à un bruit d'arme traumatisant. Les seuils auditifs sont étudiés 20 minutes, 24 heures, 48 heures 7 jours et 14 jours après le traumatisme. A l'issue, les animaux sont sacrifiés, les cochlées prélevées pour analyse histologique. La figure 16 présente la chronologie de l'expérimentation.

PA = Périlymphe artificielle
MP = Méthylprédnisolone

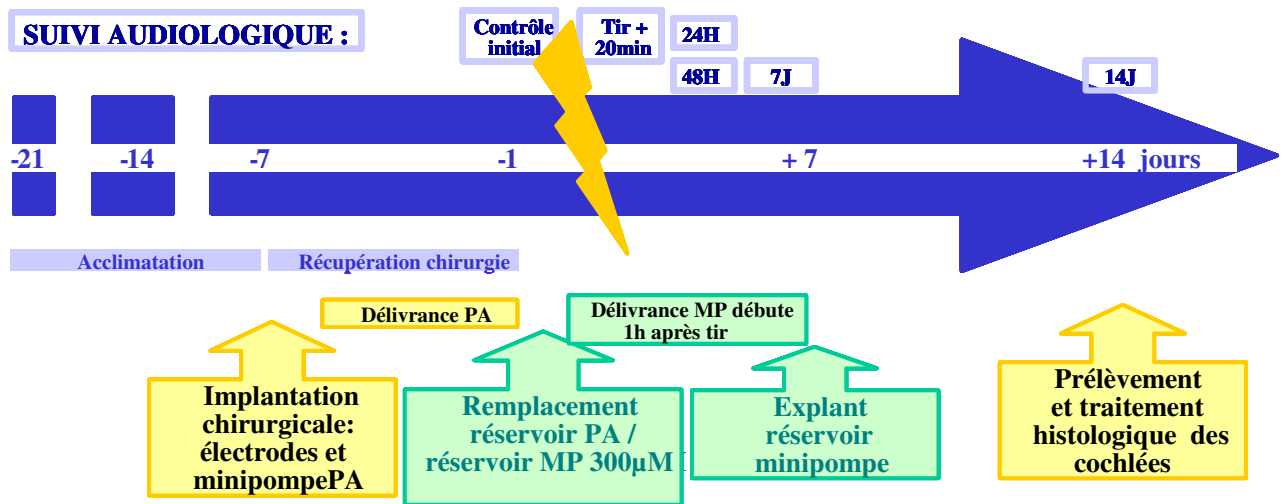


Figure 16 : Chronologie expérimentale

4. Résultats

4.1 Résultats préliminaires

L'expérimentation préliminaire visait à étudier l'influence de la perfusion locale de périlymphe ou de méthylprednisolone sur le potentiel d'action cochléaire. L'administration durant 7 jours de périlymphe artificielle ne modifie pas les seuils auditifs. Aucune variation significative n'est observée lors de l'administration de méthylprednisolone dont la concentration varie de 200 à 500 μM . Par contre, l'administration de 1000 μM s'est accompagnée, chez un animal, d'une augmentation importante des seuils de l'audition. Devant ces résultats, nous avons choisi d'utiliser une solution de MP dosée à 300 μM pour la suite de l'expérimentation.

4.2 Pertes auditives après exposition au bruit

Les pertes auditives au cours du temps pour les oreilles non implantées (n=10) et les oreilles traitées par la MP (n=10) ont été évaluées : 20 minutes après le traumatisme (avant traitement), on n'observe pas de différence significative entre les deux groupes. Des différences significatives apparaissent après 48 heures de récupération pour les fréquences supérieures à 8 kHz ($p < 0,05$). Ainsi, pour 19 kHz, les pertes atteignent 50 dB (esm= 6) pour les oreilles non traitées et 25 dB (esm= 7) pour les oreilles traitées. Après 7 jours de récupération, les différences entre les deux groupes s'amenuisent et restent significatives pour une seule fréquence (19 kHz). Après 14 jours de récupération, on n'observe plus de différence entre les deux groupes.

4.3 Pertes cellulaires

L'analyse histologique permet le dénombrement des cellules ciliées manquantes en fonction de leur position sur la cochlée et donc de leur fréquence de réponse. L'essentiel des pertes cellulaires touche les cellules répondant aux fréquences allant de 3 à 6 kHz. Sans traitement, les pertes s'étendent de part et d'autre de cette zone. Des différences significatives ($p < 0,01$ et $p < 0,05$) sont observées pour les fréquences allant de 8 à 16 kHz. Globalement, pour les oreilles non implantées, le pourcentage de pertes cellulaires atteint 30 % et 46 % pour les CCI et les CCE respectivement. Pour les oreilles traitées, ces pourcentages sont de 8 et 16 %. Les différences entre les deux groupes sont significatives pour chaque type cellulaire. Quelque soit le groupe, les pertes en cellules ciliées internes sont inférieures à celles observées sur les cellules ciliées externes.

5. Conclusion

En conclusion, cette étude démontre que l'administration intra-cochléaire de méthylprednisolone, en continu durant 7 jours, après un traumatisme sonore par bruit d'arme, accélère la récupération et préserve en partie la survie des cellules ciliées auditives. Cependant, les audiogrammes réalisés en fin d'expérimentation montrent que les seuils auditifs ne sont pas meilleurs après traitement. Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre comment la MP peut maintenir la survie de cellules auditives et pourquoi ces cellules perdent leur fonctionnalité.

PUBLICATION 1

2^{ème} PARTIE : Efficacité de l'administration à long terme de magnésium après traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye.

Cette expérimentation a été publiée dans la revue *Hearing Research* sous le titre « *Long-term administration of magnesium after acoustic trauma caused by gunshot noise in guinea pigs* », **Abaamrane L.**, Raffin F., Gal M., Avan P., Sendowski I. (*Hearing Research*, 2009, 247: 137-145).

1. Introduction

Depuis plusieurs années, chercheurs et cliniciens ont démontré l'influence du magnésium dans la susceptibilité et la récupération après traumatisme sonore. Un déficit en magnésium majore les pertes auditives chez le cobaye exposé à un bruit continu (Ising et coll., 1982), ou impulsionnel répétitif (Devrière et coll., 1991). L'administration préventive de magnésium s'est révélée efficace sur les pertes auditives liées au bruit : Scheibe et coll. (2000) montrent qu'une supplémentation orale en magnésium réduit significativement les pertes auditives chez des cobayes soumis à une série d'impulsions (2280 fois 167 dB SPL). En revanche, ils n'observent pas d'effet significatif sur les pertes après exposition à un bruit d'arme (187 dB SPL). Pourtant, Attias et coll. (1994) ont montré qu'une supplémentation orale en magnésium diminuait les pertes auditives observées chez des militaires soumis à un entraînement de tir durant 2 mois. Si le magnésium peut être utilisé comme prophylaxie du traumatisme sonore, l'étude de Scheibe et coll. (2001) montre que cet ion peut présenter un intérêt dans le traitement de cette pathologie : chez des animaux soumis à une série d'impulsion (167 dB SPL, 1/s, 38 min), une administration par voie

générale de magnésium diminue significativement les pertes auditives à 7 jours. Ce traitement est d'autant plus efficace qu'il a été mis en œuvre rapidement.

2. Objectif de l'étude

Dans une étude que nous avons réalisée chez le cobaye traumatisé par un bruit d'arme (FAMAS à blanc, 3 tirs de 170 dB SPL), nous avons montré que l'administration thérapeutique de magnésium (pendant 7 jours) diminuait significativement les pertes auditives 7 jours après le tir (Sendowski et coll., 2006b). Cependant, après 14 jours de récupération, il existe des différences entre les deux lots mais la significativité a tendance à disparaître. Nous nous sommes donc demandé si la prolongation du traitement n'améliorerait pas son efficacité. Cette étude a donc pour objectif d'évaluer l'efficacité de l'administration à long terme de magnésium (1 mois comparé à 7 jours) après traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye. L'efficacité du magnésium est évaluée après 3 mois de récupération par rapport à un groupe témoin recevant un placebo (NaCl) et un groupe traité par des corticoïdes par voie générale (traitement de référence chez l'homme).

3. Protocole général

Le protocole précis de l'expérimentation est détaillé en ANNEXE 3 (page 275).

65 cobayes de souche Dunkin Hartley (Charles Rivers France), femelles de 300-500 grammes, ont été utilisés. Ils présentaient tous un réflexe de Preyer satisfaisant et des seuils auditifs contrôles normaux. Le protocole expérimental avait été soumis préalablement à l'avis du comité d'éthique animale du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées (protocole n° 2005/14.0).

L'évaluation de la fonction auditive est triple :

- les seuils auditifs (2 à 32 kHz) sont estimés par la méthode des potentiels évoqués auditifs (PEA) qui ne nécessite pas d'implantation chronique ;
- l'atteinte des cellules ciliées externes est évaluée par la mesure des produits de distorsion acoustique (PDA, qui reflète l'état des cellules ciliées externes) (2 à 22 kHz), méthode non invasive ;
- les pertes cellulaires sont observées et dénombrées en microscopie optique en fin d'expérimentation.

Les animaux ont été répartis de façon aléatoire en 5 groupes :

- Groupe 1 : traitement magnésium de 7 jours. Le protocole est celui utilisé dans notre précédente étude : injection sous-cutanée de magnésium durant 3 jours (0,29 mmol MgSO₄/100g) et une eau de boisson supplémentée en magnésium durant une semaine (39 mmol MgCl₂/l).
- Groupe 2 : traitement magnésium de 1 mois : même protocole que ci-dessus mais la supplémentation dans l'eau de boisson a lieu durant 1 mois.
- Groupe 3 : groupe témoin recevant 3 injections de NaCl et de l'eau non supplémentée.
- Groupe 4 : groupe traité par de la méthylprednisolone (5 injections intrapéritonéales 20 mg/kg). Ce groupe est important car il sert de « référence traitement classique ». En effet, chez l'Homme, tous les protocoles comprennent l'administration de corticoïdes par voie générale. Même si l'on démontre une efficacité du magnésium à long terme, la question de son efficacité relative par rapport au traitement de référence nous sera inévitablement posée. La dose de 20 mg/kg a été retenue car dans une précédente étude nous n'avions pas observé

d'effet significatif à 10 mg/kg jusqu'à 14 jours après traumatisme sonore (Sendowski et coll., 2003).

La figure 17 présente la chronologie expérimentale.

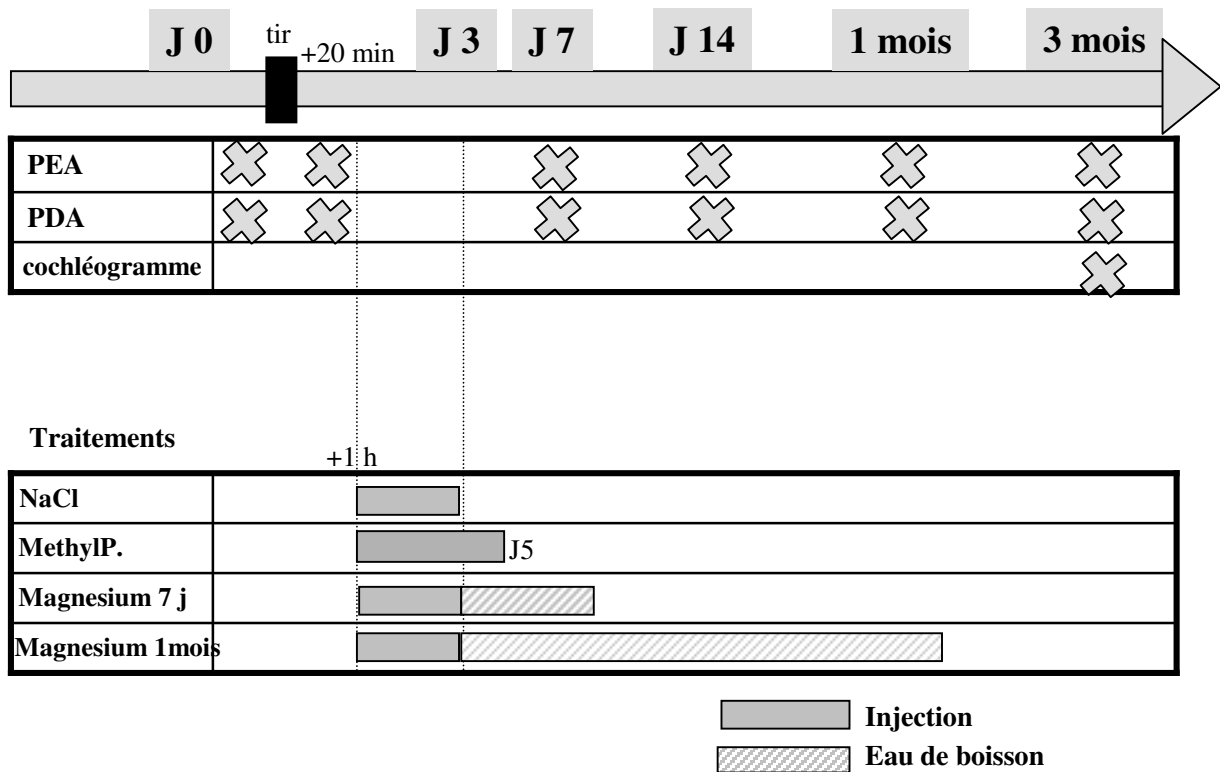


Figure 17 : Chronogramme expérimental.

4. Résultats

4.1 Évolution des pertes auditives

Les pertes auditives sont maximales 20 minutes après le tir, le maximum atteignant plus de 40 dB pour les fréquences situées de 13,5 à 16 kHz. La récupération maximale s'observe entre 20 minutes et 7 jours (récupération précoce). Cette récupération initiale existe aussi

pour le groupe témoin (NaCl). Une récupération tardive (après 7 jours) s'observe sur quelques fréquences pour les groupes témoin, Mg 7 jours et Mg 1 mois. En ce qui concerne le groupe MP, la récupération est d'emblée maximale à 7 jours. Nous n'avons jamais observé d'évolution significative entre 1 mois et 3 mois, et ce, quelque soit le traitement. Enfin, après 3 mois de récupération, il existe des pertes fonctionnelles définitives pour tous les groupes. Ces pertes sont maximales aux alentours de 8-10 kHz et atteignent environ 20 dB.

Les traitements ont été comparés entre eux à différents temps d'observation. Après tir (et avant traitement), les pertes sont homogènes. 7 jours après, le groupe MP présente significativement moins de perte que le groupe témoin ($p < 0,05$). A 14 jours d'évolution, les différences significatives avec le groupe témoin sont étendues pour les groupes MP et Mg 1 mois, mais plus limitées pour le groupe Mg 7 jours.

Après 3 mois d'évolution c'est le groupe Mg 1 mois qui présente les pertes auditives les moins élevées. Ainsi, pour 9,5 kHz, les pertes s'élèvent à 24,3 dB (esm= 2,9) pour le groupe témoin et à 13,2 dB (esm= 3,4) pour les animaux traités par du magnésium durant 1 mois.

4.2 Produits de distorsion

L'amplitude du produit de distorsion $2f_1-f_2$ avant traumatisme sonore oscille entre 20 et 30 dB SPL, ce qui est conforme aux données de la littérature (Emmerich et al. 2000, Tan et coll. 2001). Après tir, on observe une diminution significative des PDA sur la majorité des fréquences étudiées et ce, pour tous les groupes. Dans le groupe témoin, cette diminution se poursuit entre le traumatisme et le 7^{ème} jour, pour les fréquences allant de 2,4 à 20,7 kHz ($p < 0,01$ et $0,05$). On n'observe pas de diminution tardive significative pour les groupes MP

et Mg 7 jours. Pour le groupe Mg 1 mois, quelques fréquences (2,2 à 3,1 kHz et 5,7 à 8 kHz) présentent des PDA à 3 mois significativement inférieurs à ceux d'un mois.

Avant tir et 20 minutes après tir, on n'observe pas de différence significative entre les groupes. Après 7 jours de traitement, les animaux traités par de la méthylprednisolone présentent une meilleure amplitude que les témoins NaCl pour des fréquences avoisinant 3 kHz mais ces différences ne se poursuivent pas dans le temps. Après 1 mois d'évolution, le groupe Mg 1 mois présente le meilleur DPgramme. A long terme (3 mois), l'amélioration liée au traitement est modérée mais significative ($p < 0,05$). Elle concerne essentiellement les groupes traités par du magnésium pour les fréquences allant de 9 à 20 kHz. Après trois mois d'évolution, cette diminution est maximale pour $f_2 = 10$ kHz (- 30 dB) dans le groupe témoin et pour $f_2 = 8-9$ kHz dans les groupes traités (-20 dB environ).

Nous nous sommes intéressés plus spécifiquement à l'évolution individuelle des produits de distorsion entre le traumatisme et le 7^{ème} jour de récupération. Chez certains animaux (groupe 1), la chute des PDA se poursuit après traumatisme, entre 20 minutes et 7 jours. Chez d'autres (groupe 2), les PDA regagnent de l'amplitude au cours du temps. Enfin, dans un troisième groupe, les PDA sont affectés immédiatement par le tir et n'évoluent plus. Pour l'ensemble de nos animaux, 38 % appartiennent au groupe 1, 21 % au groupe 2 et 40 % au groupe 3. Parmi les animaux du groupe 1, la moitié a un DPgramme qui récupère partiellement entre 7 et 14 jours. Si l'on étudie les pertes auditives après 3 mois en fonction des groupes, on montre que ces pertes sont significativement inférieures pour les animaux du groupe 3 c'est-à-dire pour ceux ayant présenté une légère récupération des produits de distorsion à 7 jours. Ces derniers résultats n'ont pas été inclus dans la publication.

4.3 Pertes cellulaires

Les pertes cellulaires concernent davantage les cellules ciliées externes que les cellules ciliées internes. Les trois rangées de cellules ciliées externes sont affectées de façon équivalente.

Si l'on considère le pourcentage global de perte cellulaire sur l'ensemble de la cochlée pour chaque rangée de cellules ciliées et chaque groupe de traitement, on observe que, dans les groupes traités par du magnésium, les pertes sont significativement moindres comparativement au contrôle pour les CCE2 et CCE3. Ainsi, après 3 mois d'évolution, 40 % (esm = 6) des CCE3 ont disparu dans le groupe témoin, 30 % (esm = 6) dans le groupe MP, 27 % (esm = 5) dans le groupe Mg 7 jours et 15 % (esm = 3) pour Mg 1 mois.

Les cochléogrammes analysent plus finement ces pertes. Les traitements semblent diminuer les pertes cellulaires de part et d'autre d'une zone située vers 4 kHz. La protection la plus efficace est obtenue par l'administration de magnésium durant 1 mois. Les différences sont significatives essentiellement pour les fréquences situées de 5 à 15 kHz.

5. Conclusion

En conclusion, cette étude a montré que :

- 1) Après traumatisme sonore par bruit d'arme, une récupération spontanée des seuils auditifs apparaît. Elle est maximale avant 7 jours, se poursuit modérément jusqu'à 14 jours.
- 2) Les produits de distorsions évoluent différemment des seuils auditifs, puisqu'en moyenne leur dégradation se poursuit jusqu'à 7 jours. Les quelques animaux qui

présentent une amélioration des PDA avant 7 jours ont des seuils auditifs moins affectés après 3 mois d'évolution.

- 3) Les cochléogrammes montrent que les traitements peuvent limiter les pertes cellulaires de part et d'autre d'une zone centrée sur 4 kHz environ. Cette zone est vraisemblablement trop lésée pour être sauvegardée.
- 4) Les résultats obtenus sont meilleurs lorsque l'on prolonge l'administration de magnésium durant 1 mois après le traumatisme, au lieu de 7 jours. Ceci signifie que des processus métaboliques tardifs apparaissent et que ces processus peuvent être limités par un traitement adéquat.
- 5) L'administration de methylprednisolone à forte dose (5 jours) accélère la récupération mais le bénéfice à 3 mois est modéré, tout comme le traitement magnésium sur 7 jours.
- 6) L'administration de magnésium durant un mois donne les meilleurs résultats à long terme.

PUBLICATION 2

3^{ème} PARTIE : Efficacité des anti-apoptotiques par voie locale chez le cobaye.

Cette étude a été menée en deux étapes. Nous nous sommes d'abord intéressés à l'apparition de la mort cellulaire par apoptose après traumatisme sonore ou par bruit d'arme ou par bruit continu. Dans cette étude préliminaire, nous avons détecté et quantifié l'apoptose de manière cinétique après un traumatisme par bruit d'arme comparé au bruit continu. Cette étude fait l'objet d'une publication en préparation qui s'intitule « *Gunshot or continuous noise-induced hair cells death in guinea pig cochlea : cells morphology and kinetic evolution* » (*Abaamrane L., Holy X., Gentilhomme E., Raffin F., Butigieg X., Schmerber S., Sendowski I.*). Par la suite, nous avons testé l'efficacité de l'administration de deux anti-apoptotiques après un traumatisme sonore par bruit d'arme. Cette étude a également permis la soumission d'une publication dans la revue *Hearing Research* sous le titre : « *Intracochlear perfusion of leupeptin and z-VAD-FMK : influence of antiapoptotic agents on gunshot noise-induced hearing loss* » (*Abaamrane L., Raffin F., Schmerber S., Sendowski I.*).

A. Etude préliminaire : cinétique comparative de l'apoptose après traumatisme sonore par bruit continu versus bruit d'arme

1. Introduction

Depuis quelques années, la mort des cellules sensorielles auditives causée par un traumatisme sonore intéresse de nombreux chercheurs. Des études récentes ont montré l'existence de deux types de mort cellulaire après l'exposition à un bruit de forte intensité : l'apoptose et la nécrose (Hu et coll., 2002; Wang et coll., 2003; Yang et coll; 2004). Dans

un modèle de bruit continu, Yang et coll. (2004) attribuent les premières conséquences lésionnelles cochléaires à la mort par apoptose alors que les conséquences plus tardives sont dues de manière équivalente aux morts par nécrose et apoptose. Après un traumatisme sonore par bruit impulsionnel répétitif, Hu et coll. (2006) ont montré que la mort cellulaire par apoptose apparaît très rapidement (5 minutes après l'exposition au bruit). Les mécanismes conduisant à la mort des cellules ciliées après une exposition à un bruit continu ou un bruit impulsionnel présentent des différences mais celles-ci restent encore mal identifiées. Nilsson et coll. (1987) ont montré que les cellules ciliées externes et internes étaient lésées de façon différente après un traumatisme sonore par bruit continu ou par bruit impulsionnel d'énergie sonore équivalente même si les seuils auditifs étaient similaires. La récupération spontanée diffère selon le type de bruit traumatisant : elle est toujours logarithmique lorsque le bruit est continu mais peut être biphasique après bruit impulsionnel. Ceci a été observé chez l'animal (Luz, 1970 ; Hamernik et coll., 1974) et chez l'Homme (Dancer et coll., 1991). Plus récemment, une étude épidémiologique chez une population de travailleurs a révélé que les conséquences d'un bruit impulsionnel sur les pertes auditives sont plus importantes que celles provoquées par un bruit continu d'énergie équivalente (Zhao et coll., 2005).

2. Objectif de l'étude

Beaucoup d'études de la mort cellulaire après traumatisme sonore par bruit continu ou par bruit impulsionnel répétitif existent (Hu et coll., 2000 ; Hu et coll. 2002 ; Nicotera et coll., 2003 ; Yang et coll., 2004 ; Hu et coll., 2006 ; Bohne et coll., 2007 ; Hu et coll., 2008) alors que les études d'un traumatisme sonore impulsionnel pur restent rares. Le bruit d'arme est un exemple de bruit impulsionnel pur et concerne surtout le personnel militaire.

L'objectif de cette étude est d'éclairer les mécanismes par lesquels l'exposition à un bruit d'arme conduit à des dommages cellulaires comparativement à une exposition à un bruit continu. Les questions posées sont : existerait-il un processus de mort par apoptose des cellules ciliées après une exposition à un bruit d'arme ? Si oui, à quel moment apparaît-il ? Est-ce que le même processus a lieu dans le cas d'une exposition à un bruit continu ? Quelle est l'évolution cinétique de la morphologie des cellules ciliées après ces deux types de traumatisme ?

3. Protocole général

Le protocole détaillé est précisé en ANNEXE 4 (page 280).

Quarante-sept cobayes femelles de souche Dunkin Hartley ont été utilisés dans cette étude (Charles River France). Ils présentaient tous un réflexe de Preyer normal. Le protocole de cette étude a reçu l'avis favorable du comité d'éthique animal du Centre de Recherches de Santé des Armées (autorisation n°2007/19.0).

Les animaux ont été exposés à deux types de bruit traumatisant, l'un continu, l'autre impulsionnel conduisant à une élévation permanente des seuils équivalente. Une étude préliminaire sur 16 animaux a permis d'évaluer l'atteinte fonctionnelle et les pertes cellulaires totales dans les deux cas après 14 jours d'évolution. Puis nous avons mené une étude à la fois qualitative et quantitative c'est-à-dire que nous avons quantifié la mortalité des cellules ciliées dans les deux cas de traumatisme sonore et en parallèle nous avons observé leur morphologie.

Les animaux ont donc été répartis en deux groupes généraux : un groupe (n=12) a été exposé à trois tirs de FAMAS à blanc de 174 dB SPL (groupe « bruit d'arme ») et l'autre (n=12) a été exposé à un bruit continu de 137 dB centré à 4 kHz pendant 45 minutes

(groupe « bruit continu »). Les animaux de chaque groupe sont sacrifiés après exposition sonore aux temps suivants : 1h, 3h, 24h, 48h, 7j et 14j.

Les cochlées sont alors prélevées pour réaliser les marquages immuno-histologiques de la mort cellulaire (technique TUNEL). Sept animaux supplémentaires ont été utilisés pour les études morphologiques de microscopie à balayage. Le chronogramme expérimental est présenté figure 1.

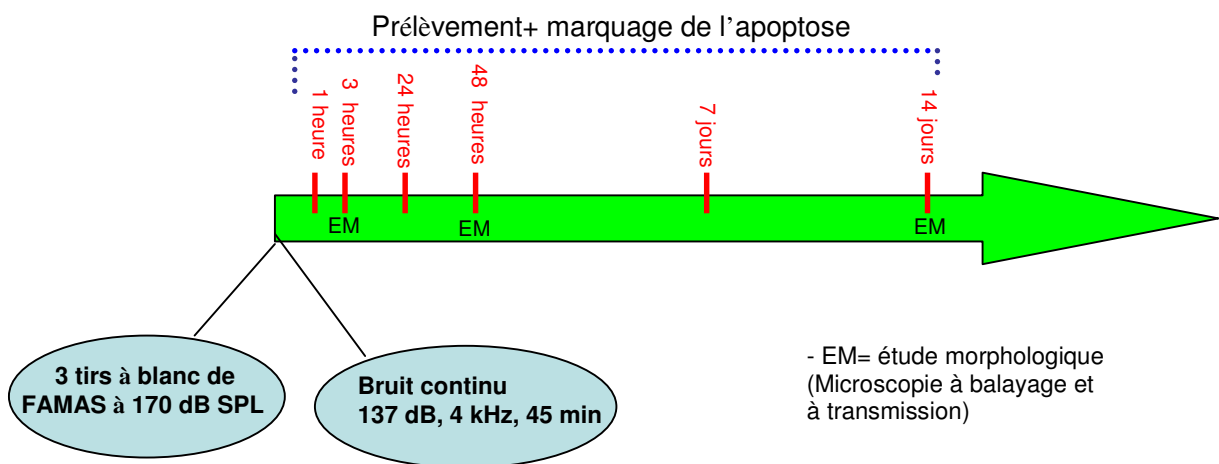


Figure 18 : chronogramme expérimental.

4. Résultats

4.1 Etude préliminaire : évaluation des lésions des deux types de traumatisme

Fonctionnalité des cellules ciliées

20 minutes après l'exposition, les pertes sont de 49,3 dB (esm= 4) en moyenne pour le bruit continu et de 30,3 dB (esm= 3) après tir. Les différences entre les deux groupes sont significatives hormis pour 4 kHz. Après 14 jours d'évolution, on observe une récupération spontanée dans les deux groupes. Les pertes définitives varient entre 20 et 30 dB. Les différences entre les deux groupes ne sont pas significatives sauf pour 8 kHz ($p \leq 0,05$).

Pertes cellulaires

De façon surprenante, ce sont les animaux exposés au bruit d'arme qui ont présenté les plus grandes pertes cellulaires. Toutes les rangées cellulaires sont touchées. Les lésions sont significativement plus étendues après traumatisme sonore par bruit impulsionnel surtout de part et d'autre de la zone résonnant à 4 kHz.

4.2 Quantification des cellules ciliées apoptotiques

Dans les deux types de traumatismes, seules les cellules ciliées externes ont été les plus vulnérables.

Après un traumatisme par bruit d'arme

Une heure après l'exposition, le pourcentage de cellules apoptotiques dans la première rangée de cellules ciliées externes est de moins de 5 %. Ce chiffre atteint 10 % à 3 heures après l'exposition. Par la suite, ce pourcentage diminue avec le temps jusqu'à disparaître 7 jours et 14 jours après le traumatisme. Ce résultat confirme que l'apoptose des cellules ciliées apparaît de façon précoce après le traumatisme. Ceci nous a permis de définir une fenêtre d'apparition de l'apoptose allant de 1 heure à 24 heures après l'exposition (maximum à 3 heures).

Après un traumatisme par bruit continu

Le nombre de cellules apoptotiques est moins important que pour un traumatisme sonore par bruit d'arme. Le pourcentage de cellules ciliées externes apoptotiques est toujours inférieur à 5% de 1 heure à 24 heures après le traumatisme. Comme pour le traumatisme par bruit d'arme, aucune cellule ciliée apoptotique n'apparaît à 7 jours et 14 jours post-traumatisme.

4.3 Morphologie des cellules ciliées

Microscopie électronique à balayage

Les cochlées ont été observées sans traumatisme puis à 3 heures, 48 heures, et 14 jours après l'exposition sonore. Les images de l'organe de Corti sans traumatisme présentent une régularité des cils et une harmonie cellulaire, les cellules de soutien (cellules de Hensen) sont globulaires et contiennent des gouttelettes lipidiques proéminentes. 3 heures après le traumatisme par bruit d'arme, les cils sont désamarrés et quelques protubérances cytoplasmiques apparaissent. 48 heures après le tir, certaines cellules ciliées externes ont disparu laissant un espace intercellulaire visible et des anomalies de la membrane cellulaire sont présentes. Les cils sont désordonnés. Les cellules de Hensen semblent avoir perdu leur contenu lipidique dans l'espace endolymphatique et présentent des dépressions. 14 jours après le tir, les cellules ciliées manquantes sont remplacées par de larges cellules épithéliales. Les anomalies ciliaires sont encore visibles et sont surtout observées au niveau de la troisième rangée de cellules ciliées externes. Les stéréocils se rejoignent à leur base formant des masses irrégulières. Après une exposition au bruit continu, les cils présentent également des anomalies. 48 heures après traumatisme par bruit continu, les images

montrent que les stéréocils de la première rangée de cellules ciliées externes sont brisés à leur base.

Microscopie électronique à transmission

Les images de l'organe de Corti après traumatisme sonore par bruit d'arme montrent la présence de vacuolisations importantes au niveau de la synapse afférente des cellules ciliées internes.

4.4 Conclusion et perspectives

Dans cette étude, nous avons montré la présence d'un maximum de cellules ciliées apoptotiques trois heures après le traumatisme sonore par bruit d'arme. Cette donnée est importante pour la suite de notre recherche. En effet, l'utilisation d'un traitement local utilisant des anti-apoptotiques pourrait être une nouvelle thérapeutique du traumatisme sonore par bruit d'arme. Ces anti-apoptotiques doivent donc être délivrés dans les premières heures après le traumatisme. Cette étude fait l'objet de la partie suivante.

B. Efficacité de l'administration intra-cochléaire de deux molécules anti-apoptotiques : leupeptine et z-VAD-FMK.

1. Introduction

L'étude précédente confirme le phénomène d'apoptose après traumatisme sonore par bruit impulsionnel. L'apoptose apparaît précocément (avant 3 heures) et se prolonge jusqu'à 7

jours. De nombreuses substances sont capables d'inhiber des régulateurs ou exécuteurs de l'apoptose des cellules ciliées. L'utilisation de ces substances anti-apoptotiques représente une nouvelle stratégie thérapeutique du traumatisme sonore à condition d'en évaluer le coût ainsi que l'innocuité. L'utilisation d'agents anti-apoptotiques directement perfusés dans la cochlée limite les effets secondaires de l'injection par voie générale. Parmi ces agents anti-apoptotiques, la leupeptine et le z-VAD-FMK (z-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone) pourraient représenter des substances thérapeutiques intéressantes. La leupeptine est un puissant inhibiteur des calpaines (protéases dépendantes du calcium qui participent à l'apoptose). Dans une étude, Wang et coll. (1999) ont montré que la leupeptine est efficace dans le cas d'un traumatisme sonore par bruit continu (48h, 4 kHz à 100 ou 105 dB SPL). De plus, le traumatisme sonore provoque une activation de la caspase-3 et la perfusion intra-cochléaire de l'inhibiteur de la caspase-3 (z-DEVD-FMK) limite le clivage de l'actine F dans les cellules ciliées externes chez le chinchilla (Hu et coll., 2002). L'inhibiteur général des caspases, le z-VAD-FMK, est également efficace pour limiter les lésions cochléaires dans le cas d'une toxicité à la gentamycine (Okuda et coll., 2005). La majorité des études utilisant les anti-apoptotiques concerne le traumatisme sonore par bruit continu. Rares sont les études qui concernent le traumatisme sonore par bruit d'arme. Récemment, Coleman et coll. (2007) ont testé l'efficacité d'un inhibiteur de l'apoptose, l'AM-111, après un traumatisme sonore par bruit impulsionnel simulant un bruit d'arme (155 dB SPL, simulant le bruit d'un tir au M-16). Les auteurs ont montré que l'AM-111 protège les cellules ciliées des pertes auditives permanentes.

2. Objectif de l'étude

Dans une étude précédente, nous avons montré la présence de cellules ciliées apoptotiques dans les premières heures après le traumatisme sonore par bruit d'arme.

Le but de cette présente étude est de tester l'efficacité des deux agents anti-apoptotiques, la leupeptine et le z-VAD-FMK, administrés par voie intra-cochléaire rapidement après traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye. La mesure d'efficacité est réalisée à la fois au niveau fonctionnel (suivi auditif) et au niveau histologique (mesure des pertes cellulaires en fin d'expérimentation).

3. Protocole général

Le protocole précis de l'expérimentation est détaillé en ANNEXE 5 (page 285).

Soixante cobayes de souche Dunkin Hartley (Charles Rivers France) ont été utilisés dans cette expérimentation. Ils présentaient tous un réflexe de Preyer normal. Le protocole de cette étude a reçu l'avis favorable du comité d'éthique animal du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées (Autorisations n° 2007/19.0 ; 2008/26.0).

Trois études préliminaires ont été menées dans le but de montrer l'innocuité de l'implantation de la micropompe osmotique ainsi que pour déterminer une concentration non toxique des substances testées.

Avant l'exposition au bruit d'arme, les seuils auditifs ont été mesurés par la technique des potentiels évoqués auditifs (PEA) (ou Auditory Brainstem Responses (ABR) des anglosaxons) chez le cobaye anesthésié (Kétamine, 40mg/kg ; Médétomidine 10mg/kg, injection intra-péritonéale) (IMALGENE®; DOMITOR®). Seuls les animaux ayant des seuils auditifs équivalents au niveau des deux oreilles sont retenus pour l'expérimentation. Chaque animal a été exposé à trois tirs de FAMAS (170 dB SPL) puis une micropompe osmotique contenant la substance anti-apoptotique a été implantée rapidement (1 heure

après les tirs, durée de l'intervention chirurgicale) dans l'une des cochlées, l'autre cochlée servant de témoin. Le fait d'utiliser chaque animal comme son propre contrôle permet d'atténuer largement la grande variabilité existante entre les animaux. Les seuils auditifs ont été mesurés à 48 h, 7 jours et 14 jours après traumatisme. A la fin de l'expérimentation, l'animal est sacrifié et les cochlées sont prélevées pour une étude histologique (comptage des pertes cellulaires). Le chronogramme expérimental de l'étude est présenté figure 1.

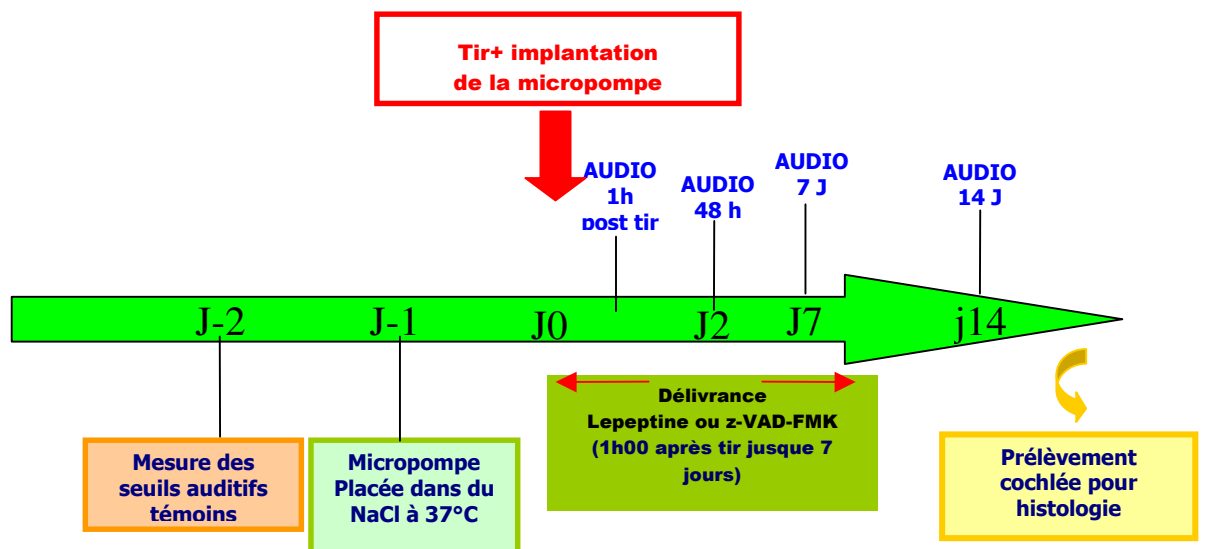


Figure 19 : Chronogramme expérimental

4. Résultats

4.1 Etudes préliminaires

Une première étude avait pour but d'évaluer l'influence de l'implantation de la micropompe osmotique contenant de la périlymphe artificielle sur les seuils auditifs. 7

jours après l'implantation, les seuils auditifs mesurés pour les oreilles implantées n'ont pas été significativement différents de ceux des oreilles non implantées.

Une seconde étude avait pour but de vérifier l'innocuité de la leupeptine sans traumatisme sonore à la concentration de 1 mg/ml. Les seuils auditifs n'étaient pas différents significativement entre les oreilles traitées et les oreilles non traitées.

Enfin, une gamme de concentration en z-VAD-FMK a été testée sans traumatisme sonore : 250 μ M ; 100 μ M et 50 μ M. Les solutions de concentration 250 et 100 μ M ont été toxiques pour l'audition des animaux. Les seuils auditifs étaient significativement plus élevés pour les oreilles traitées. Aucune toxicité n'a été relevée pour une solution à 50 μ M. Cette concentration a été gardée pour la suite de l'étude.

4.2 Pertes auditives

Traitement avec la leupeptine

A chaque temps de mesure (48h, 7 jours et 14 jours), aucune différence significative entre les oreilles traitées et non traitées n'a été observée. La leupeptine n'a présenté aucun effet sur les pertes auditives induites par le bruit d'arme.

Traitement avec le z-VAD-FMK

De façon intéressante, 48 heures après le traumatisme, des différences significatives entre les pertes auditives des oreilles traitées et non traitées ont été mesurées pour les fréquences 8, 16, 19 et 22 kHz ($p < 0,01$). Ainsi, à 16 kHz, les pertes auditives moyennes étaient 27 dB (esm= 4) pour les oreilles traitées et de 44 dB (esm= 4) pour les oreilles non traitées. Après 7 jours et 14 jours de récupération, les différences entre les groupes diminuent et ne sont plus significatives.

4.3 Pertes cellulaires

Traitement avec la leupeptine

Pour les régions allant de 8 à 20 kHz correspondant à la région basale de la cochlée, les cellules ciliées externes des oreilles traitées ont présenté significativement plus de perte ($p < 0,01$ ou $p < 0,05$). Pour les autres fréquences, aucune différence significative entre les oreilles traitées et non traitées n'a été observée.

Traitement avec le z-VAD-FMK

Les pertes cellulaires ont été significativement moins importantes pour les oreilles traitées et pour chaque rangée de cellules ciliées pour les fréquences allant de 3 à 12 kHz. Ainsi, à 8,3 kHz, le pourcentage de pertes cellulaires dans la rangée des cellules ciliées internes a été de 39 % (esm= 17) pour les oreilles non traitées et de 5% pour les oreilles traitées (esm= 4). Dans la première rangée de cellules ciliées externes et pour cette même fréquence, le pourcentage de perte cellulaire a été de 83% (esm= 14) pour les oreilles non traitées contre 46,5% (esm= 15) pour les oreilles traitées.

5. Conclusion

En conclusion, cette étude a montré que l'administration intra-cochléaire de z-VAD-FMK de façon continue pendant 7 jours après un traumatisme sonore par bruit d'arme accélère la récupération auditive et permet la survie des cellules ciliées. Cependant, la leupeptine n'a pas été efficace dans notre modèle. Ces résultats suggèrent qu'une des premières étapes dans la physiopathologie du traumatisme sonore par bruit d'arme implique la mort des cellules ciliées par la voie des caspases de l'apoptose plutôt que par la voie des calpaines.

Les inhibiteurs de caspases sont donc de bons candidats thérapeutiques pour limiter les pertes cellulaires consécutives au bruit. Cette étude confirme que le traitement doit être administré précocement après le traumatisme.

PUBLICATION 3

(En préparation)

Authors : L. Abaamrane^a, X. Holy^b, E. Gentilhomme^a, F. Raffin, X. Butigieg^b, S. Schmerber^c, I. Sendowski^a.

a Centre de Recherches du service de santé des armées, 24 avenue des maquis du Grésivaudan BP 87. 38702, La Tronche, France.

b Institut de médecine aérospatiale du service de santé des armées, BP 73, 91223 Brétigny-sur Orge Cedex, France.

c Hôpital universitaire de Grenoble, service d'otologie et otoneurologie, BP 217, 38043 Grenoble cedex 09, France

E-mail addresses : L.abaamrane@crssa.net

xholy@imassa.fr

Fraffin@crssa.net

xbutigieg@imassa.fr

Egentilhomme@crssa.net

Sschemerber@chu-grenoble.fr

Isendowski@crssa.net

Title : Gunshot or continuous noise-induced hair cells death in guinea pig cochlea : cells morphology and kinetic evolution

Corresponding author:

L.Abaamrane

phone: +33 (0)4 76 63 97 75

fax: +33 (0)4 76 63 69 22

e-mail: L.abaamrane@crssa.net

Postal address : CRSSA 24 av. des maquis du Grésivaudan

38702 La Tronche cedex- FRANCE

Abbreviations

ABR, auditory brainstem responses

dB SPL, decibel sound pressure level

IHC, inner hair cell

PI, propidium iodide

PTS, permanent threshold shifts

NIHL, noise-induced hearing loss

OHC, outer hair cells

TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling

Abstract

Apoptotic cell death has been implicated following continuous noise exposure or repetitive impulse noise exposure. The original goal of the present study was to conduct a comparative study between continuous noise-induced (137 dB at 4000 Hz for 45 minutes) and gunshot noise-induced (three blank gun shots from a FAMAS F1 rifle, 174 dB SPL peak) hair cell death in guinea pigs. For the two type of trauma, hair cells apoptosis was evaluated using TUNEL method in a kinetic manner (1 hour, 3 hours, 24 hours, 48 hours, 7 days and 14 days following exposure). Morphological studies of hair cells following noise exposure have been conducted using microscopy techniques. It was interesting to observe that the evolution of apoptosis appearance was different in the two groups suggesting that cell death pathways might be different depending on the noise trauma type. Gunshot noise induced more hair loss but less hearing loss than continuous noise. These results suggest that hair cells are present but not functional following continuous noise. Hairs morphology could explain this non-functionality. Although mechanisms of hair cell death remain unclear, this study presents a lighting on continuous or gunshot noise-induced hair cells death appearance and illustrations of damaged hair cells morphology.

1. Introduction

Exposure to high-intensity noise causes irreversible hearing damage. The noise causing the trauma may be continuous (concerts etc.), repetitive impulsive (industrial noise, pneumatic drills etc.) or pure impulsive (explosions, gunshot noise). In industrial countries, hearing impairment affects approximately 10 % of the population. Although noise damages many types of cells in the cochlea (Hamernick et al., 1974; Bohne et al., 1976), the most vulnerable cells are outer hair cells (OHCs). Missing OHCs are a primary contributing factor for noise-induced hearing loss (NIHL). In the past few years, hair cells death caused by an exposure to intense noise interested many studies. Recent studies have revealed two type of cell death in cochlear lesions following exposure to intense noise: apoptosis and necrosis (Hu et al., 2002; Wang et al., 2002; Yang et al; 2004). Apoptosis is a cell death process that is clearly distinct from necrosis. Apoptosis is an energy-dependent death process, in contrast, necrosis is a passive death pathway (Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002).

In a model of a continuous noise induced trauma, the early expansion of cochlear lesion has been attributed primarily to apoptosis whereas the later stage of lesion expansion was the result of an equal contribution from apoptosis and necrosis (Yang et al.; 2004). Following a repetitive impulse noise induced trauma, apoptosis has been found to be an extremely rapid process (5 minutes after the end of exposure) (Hu et al.; 2005). The mechanisms leading to cochlear hair cell death (apoptosis or necrosis) following an exposure to continuous noise or following an exposure to impulse noise comparatively seem to present some differences. Nilsson et al. (1987) have shown that both the inner hair cells (IHCs) and outer hair cells (OHCs) are differently affected depending on the type of noise (impulse or continuous), even though the auditory thresholds were similar. This

result suggests a mismatch between morphology and functionality of hair cells (Nilsson et al., 1987). Moreover, the spontaneous recovery is different depending on the type of noise: logarithmic in the case of continuous noise and diphasic in the case of impulse noise. This result was observed in animals (Luz, 1970; Hamernik et al., 1974) and in humans (Dancer et al., 1991). More recently, an epidemiological study revealed that the damage of impulse noise on hearing loss was much more than of continuous noise in a population of workers (Zhao et al., 2005).

Many hair cell death studies exist concerning continuous noise induced trauma and repetitive impulse noise induced trauma (Hu et al., 2000; Hu et al., 2002; Nicotera et al.; 2003; Yang et al., 2004; Hu et al., 2005; Bohne et al.; 2007; Hu et al., 2008) , whereas studies concerning the pure impulse noise induced trauma remain rare. Gunshot noise is an example of pure impulse noise. The gunshot noise-induced trauma affects particularly hunters, victims of terrorism attacks and military personnel. NIHL in the military continues to be a severe and costly problem despite hearing conservation programs. The objective of the current study is to give a light to the mechanisms by which an exposure to a gunshot noise lead to hair cells damages by comparison to a continuous noise.

Firstly, we have conducted a study to verify that our two models of noise exposure (continuous or gunshot noise) involve similar permanent thresholds shifts (PTS). Functional damages and hair cell losses were evaluated after a 14-days recovery period. Qualitative and quantitative studies were conducted. The mortality of hair cells in the two case of noise in a kinetic manner following the exposure were quantified. Similarly, hair cells morphology were observed.

2. Material and methods

A total of 47 female albino guinea pigs (outbred Dunkin Hartley, 300-500g, Charles Rivers, France), were used in this study. All were in good health and presented a Preyer reflex. The study protocol was approved by the local animal ethics committee (agreement n°2007.19.0)

2.1 General protocol

The animals were randomly divided into two general groups : a group was exposed to three blank gunshots from a FAMAS F1 rifle , each of 174 dB SPL (gunshot noise group) and a group was exposed to a continuous noise at 137 dB centered at 4000 Hz for 45 minutes (continuous noise group). A preliminary study evaluated auditory function by electrocochleography and hair cell losses to ensure that this two types of exposure involve similar PTS.

In order to quantify hair cells apoptosis using TUNEL method (Heatwole, 1999), these two general group were divided into 6 groups depending on the passed time between the end of the noise exposure and the sacrifice of the animal (1 hour, 3 hours, 24 hours, 48 hours, 7 days and 14 days) : animals were sacrificed 3 hours after noise exposure (3-hours group) , 48 hours after noise exposure (48-hours group), 7 days after noise exposure (7-days group) and 14 days after noise exposure (14-days group). At the end of the experimentation, cochleae were removed to carry out the immunohistological stainings in order to evaluate hair cells death.

Supplementary animals were used for electron microscopy studies studies.

2.2 Sound trauma

Before exposure, animals were given i.p anaesthetic injection of ketamine chlorhydrate 40 mg/kg (Imalgene[®], Alcyon, Landerneau, France) with medetomidine hydrochloride 10 mg/kg (Domitor[®], Alcyon, Landerneau, France)

Impulse noise exposure

The acoustic trauma, performed in an anechoic room, was facilitated by exposing the animal to three blank gun shots from a FAMAS F1 rifle. The guinea pig was placed in a hammock at a predetermined distance to obtain the selected intensity (174 dB SPL). A microphone (1/8-in; B&K type 4321), was placed parallel to the eardrum of the animal, permitted an estimation of the noise perceived in the ear. The animals received 3 gunshots and were awaked with an i.p injection of atipamezole hydrochloride 10 mg/ kg which reverses sedative and analgesic effects of medetomidine hydrochloride (Antisedan[®], Alcyon, Landerneau, France).

Continuous noise exposure

Animals were exposed to an octave-band centered at 4 kHz at 137 dB SPL during 45 minutes. The noise was generated using a generator (HP35670A) connected to an amplifier (Crown, type XLS202) and delivered to a loudspeaker (JBL Model 2450H). Exposures were carried out in an anechoic room.

A sonometer (Bruel & Kjaer) was placed parallel to the eardrum of the animal, permitted an estimation of the noise perceived in the ear. After the exposure, animals received an i.p injection of atipamezole hydrochloride 10 mg/ kg (Antisedan[®], Alcyon; Landerneau, France).

A preliminary study was conducted to evaluate the lesional consequences of the two model of noise on 16 animals.

2.3 Audiometric studies

The auditory thresholds shifts were evaluated at 20 min and 14 days following the noise exposure.

The auditory thresholds were determined by means of electrocochleography. Each animal was equipped with electrodes on the round windows of their cochleas with the same procedure as described in our previous studies (Sendowski et al., 2006).

The auditory thresholds were studied for 12 frequencies (2; 2.8 ; 4; 5.6 ; 8 ; 9.5 ;11.3; 13.5 16 ; 19 ; 22 and 32 kHz) under light anaesthetic (ketamine chlorhydrate 40 mg/kg and medetomidine hydrochloride 10 mg/kg i.p) with the animal's body temperature being maintained at $38 \pm 1^\circ\text{C}$. The equipment used to generate the sound stimuli and record the compound action potential (CAP) included two microprocessors and a programmable attenuator (system 3; Tucker-Davis Technologies, Gainesville, FL, USA). The sound stimuli consisted of bursts of pure sound (duration 13 ms; rise time 1,5 ms) presented 15 times/sec. The sound intensity ranged from 0 to 90 dB SPL in 5 dB steps. Cochlear responses were amplified ($\times 10000$) by a differential amplifier (GRASS RPS107; Astromed, Trappes, France), filtered (0,1-3000 Hz), averaged (256 samples) and stored in a Pentium PC. The CAP threshold was defined as the intensity (dB SPL) needed to elicit a measurable response.

2.4 Cochleograms

The animals were sacrificed 15 days after the noise exposure: after deep anesthesia by i.p injection of pentobarbital sodium (Dolethal[®], 50 mg/100g, Alcyon, Landerneau, France), the cochleae were quickly removed. A solution of succinate dehydrogenase containing 2.5 ml of 0.2 M sodium succinate; 2.5 ml of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.6) and 5 ml of 0.1 % tetranitro blue tetrazolium was infused through the cochlear windows. The cochleae were placed in this solution at 37°C for 2 hours and then fixed in 4% paraformaldehyde for more than 24 hours. They were dissected under a binocular microscope to remove the organ of Corti from the apex to the base. The samples, mounted in glycerin on a histological slide, were observed in blinded condition under an optical microscope (×400). The missing outer hair cells (OHCs) and inner hair cells (IHCs) were counted in 0.25 mm batches, making it possible to construct a cochleogram, which gave the percentage of destroyed cells as a function of the distance from the apex. This was then converted into a response frequency using Greenwood's model (1990), adapted for guinea pigs. Percentages of hair cell loss for each 0.25 mm length of tissue were plotted along the cochlear length for each cochlea, in order to obtain overall hair cell losses.

2.5 TUNEL assay

TUNEL staining

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling) is used to identify DNA fragments in apoptotic cells (Heatwole, 1999).

The animal were sacrificed at the the defined time after the noise exposure (1 hour, 3 hours, 24 hours, 48 hours, 7 days or 14 days): after deep anaesthesia by i.p injection of pentobarbital sodium (500 mg/kg) (Dolethal[®], Alcyon, Landerneau, France), the cochlea

were quickly removed. Cochlea were fixed with 4% paraformaldehyde and the organs of Corti were dissected. The In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein was used to measure and quantitate cell death (apoptosis) by labelling and detection of DNA fragmentation (Roche[®] Diagnostics, Meylan, France). The amount of DNA strands breaks in apoptotic cells is so large that the degree of cell labeling in this assay is an adequate discriminator between apoptotic and necrotic cells. The organs of Corti were incubated one night in ice-cold 70 % ethanol. Membranes were permeabilized with proteinase K (20 µg/ml) at room temperature for 5 minutes. The tissues were incubated in the freshly prepared DNA-labeling solution containing the TdT enzyme (terminal transferase) and fluorescein-dUTP for 2 hours at 37°C. The organs of Corti were double stained with propidium iodide (PI) at room temperature for 10 minutes. After rinsing in PBS, the organs of Corti were mounted on the slide containing antifade medium (Slowfade light Antifade kit, Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Incorporated nucleotides were visualized using a fluorescence microscope (Zeiss MC80).

Quantification of TUNEL labeled hair cells

Before inspection under a fluorescence microscope, nuclei were double labeled with red fluorescence (PI-labeled nuclei) and green fluorescence (Fluorescein- labeled nucleotides). The TUNEL-labeled hair cells (green fluorescent cells) were counted in 0.25 mm batches using a fluorescence microscope, making it possible to construct a cochleogram, which gave the percentage of TUNEL-positive hair cells as a function of the distance from the apex. This was then converted into a response frequency using Greenwood's model (1990), adapted for guinea pigs. Percentages of TUNEL-positive hair cells in each 0.25 mm length of tissue were plotted along the cochlear length as a cytocochleogram.

2.6 Morphological studies

Morphological studies of hair cells were facilitated using light or electron microscopy at different time after the acoustic trauma.

Histologic cross-section of the organ of Corti

Cross-section of a damaged basilar part of cochlea was performed. Specimen were colored using a blue toluidine coloration.

Transmission electron microscopy (TEM)

Cochleas were perfused with 2% osmic solution and the organs of Corti were dissected. Specimen were immersed in a solution of 2.5% glutaraldehyde in PBS and dehydrated in graded series of ethanol. Ultra-thin sections (70 nm) of the tissue were realized. The specimen were observed using a JEOL 1010 transmission electron microscope at 80 kV.

Scanning electron microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy is used to observe the three dimensional structure of the organ of Corti. Cochleas were quickly removed, perfused with 4 % paraformaldehyde for 2 hours and postfixed in a 2% osmic acid solution for 2 hours. The cochleas were dehydrated in graded series of ethanol solutions and the organs of Corti were dissected. After microdissection; dehydration was finished by spraying CO₂ at its critical point (Polaron machine). Specimen were fixed using a silver adhesive and were coated with gold-palladium, and observed with an FEI quanta 2000 scanning electron microscope

2.7 Statistical methods

Results were compared between gunshot noise-induced trauma and continuous noise-induced trauma and are presented as means \pm sem. The significance of the differences between hearing losses and cell losses was evaluated using a non parametric test (Mann-Whitney U-test). STATISTICA (Statsoft, Tulsa, Okla., USA) was used for these statistical analyses. The null hypothesis was rejected for $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Preliminary study

Auditory threshold shifts

The evaluation of hearing loss in a comparative study between the two type of noise exposure is shown in figure 1. 20 min following exposure, the average hearing loss was $49,3 \pm 4$ dB for the cointunuous noise and $30,3 \pm 3$ dB for the gunshot noise. Differences between the two groups are significant for all frequencies except 4 kHz. 14 days following exposure, a spontaneous recovery was observed. The final hearing losses fluctuate between 20 and 30 dB. Differences between the two groups are not significant for all frequencies except 8 kHz ($p < 0,05$).

Hair cells losses

The percentages of missing hair cells are presented in the graphs in figure 2. OHCs damages were significantly more important in the case of an exposure to a gunshot noise. The difference was significantly more important in a region of cochlea on either side of the

area responding to frequencies 4 to 8 kHz. The gunshot noise caused larger damages on the cochlea, the percentage of missing cells reached 80 % in the area responding to 6 kHz frequency. This same area was not preserved following a continuous noise but the areas all around were more preserved.

3.2 Quantification of apoptotic hair cells following the acoustic trauma

A fluorescent microscopic image of the TUNEL staining of the organ of Corti (control and 3 hours following gunshot noise exposure) is presented in figure 3. TUNEL-positive cells appear yellow.

The number of TUNEL-positive hair cells in function of time following noise exposure is shown in Figure 4a,b. Figure 4a shows the number of TUNEL-positive hair cells following an exposure to a gunshot noise and Figure 4b shows the number of TUNEL-positive hair cells following the continuous noise exposure.

Following gunshot noise exposure, a maximum of TUNEL labeled hair cells appeared at 3h (Fig 3b,c and Fig 4). The number of TUNEL-positive hair cells reached a maximum of 10 % in the first round of OHCs (OHC1) 3 hours post exposure. At 1 hour following noise exposure, the number of TUNEL-positive hair cells was less than 5 %. At 24 hours following gunshot noise exposure, there were between 5 to 10% of TUNEL-positive OHCs. At 48h, there were less than 5% of TUNEL-positive OHCs. At 7 days and 14 days after gunshot noise exposure, no TUNEL labeled hair cells were observed (data not shown).

This results confirmed that the apoptotic hair cells appeared early following the gunshot noise exposure. The emergence window of apoptosis was situated between 1 hour to 24 hours with an maximum appearance at 3 hours post exposure.

The number of TUNEL-labeled OHCs was less important following the continuous noise exposure comparatively with the gunshot noise exposure (Fig 4b).

The number of TUNEL-positive OHCs was always less than 5% from 1 hour to 24 hours following the acoustic trauma. Similarly with the gunshot noise trauma, no TUNEL-positive OHCs were observed at 7 and 14 days after the noise exposure (data not shown).

Continuous noise-induced apoptotic cells were less important than gunshot noise-induced apoptotic cells. Gunshot noise induced much more TUNEL-positive hair cells than continuous noise between 3 hours and 24 hours following the trauma. For the two type of noise, outer hair cells (OHCs) were the most vulnerable cells. Only OHCs appeared TUNEL-positive.

3.3 Microscopy

Histologic observation

A cross-section of a damaged basilar part of cochlea is presented in figure 5. IHCs are vacuolated (frame).

Observation under an electron transmission electron microscope (TEM)

The electronmicrographs of gunshot noise damaged cochlea are shown in figures 6a and 6b. It was interesting to observe some vacuolizations in the afferent synapse of inner hair cells (IHCs).

Observation under a scanning electron microscope

The normal organ of Corti presented a regularity of the hairs in each row (figures 7a and 7b). In the apical coil of the cochlea, the Hensen's cells have a globular appearance and contain prominent lipid droplets (figures 7g and 7h). At 3 hours following the gunshot noise exposure, important bending and separation at the tips and occasionally cytoplasmic protusions are observed (figures 7c and 7d). At 48 hours following the gunshot noise exposure, disappearance of certain OHCs was observed (figure 7e, arrows). The stereocilia are disarrayed (figure 7f). Large depression are observed on the Hensen's cells. Lipids appear to be expelled from the cell into the endolymphatic space. At 14 days following the gunshot noise exposure, the missing cells are filled up by large, polygonal, microvillated epithelial cells (figure 7k and 7m). Complete collapse of the bases of stereocilia are observed (figure 7n). After an exposition to the continuous noise, hair abnormalities are observed: they are fractured at their base (figure 8a and 8b).

4. Discussion

In this study, audiometric and histological effects of gunshot noise exposure or continuous noise exposure on cochlear hair cells have been compared. It was interesting to observe different effects in the two noise trauma examples.

At functional level, continuous noise exposure had more important lesional consequences on hair cells than gunshot noise exposure. At 20 min after the exposure, the difference in auditory function of hair cells exposed to a continuous noise in comparison with gunshot noise was approximatively 20 dB. After 14 days, a natural recovery occurs. Although cochleas exposed to a gunshot noise had a best auditory function just after the shot, they

presented, after 14 days recovery, a percentage of missing hair cells more important than those exposed to a continuous noise. Some studies have shown normal hearing thresholds in the presence of substantial hair cell loss (Hunter-Duvar and Elliot, 1972; Henderson et al., 1974; Ward and Duval, 1971) while others have shown a loss of hearing when hair cells were present (Spoendlin, 1971; Ades et al., 1974; Hunter-Duvar and Bredberg, 1974). In our study, hair cells exposed to a continuous noise seemed to be present but not functional. This fact could be explained by hairs morphology following the trauma. Hairs detachment and the interciliary bridges disconnection has been observed in our scanning microscopic images. The continuous noise could have destroyed cell hairs damaging their auditory function, but these cells remained present in the cochleogram. The same phenomena had been described by Slepecky et al. who indicated that there was a relationship between the amount of noise-induced permanent threshold shifts and the condition of the stereocilia (Slepecky et al, 1982).

Cochleas exposed to a gunshot noise presented a spectrum of missing hair cells larger along the whole length of the organ of Corti. This result is not surprising because of the different energy spectrum of the two types of noise. In the case of a gunshot noise, the energy spectrum is large and in the case of continuous noise, the spectrum is narrow and centered at 4000 Hz. Despite these differences, all the cochleograms presented a peak of percentage of missing cells around this frequency for the two noises.

In the last several years, it has become apparent that cell death is an intrinsic part of cochlear pathology in response to noise (Nicotera et al., 1999; Pirvola et al., 2000). Techniques such DNA fragmentation staining (TUNEL assay) and propidium iodide labeling have permitted to characterize the type of death. Hu et al. have demonstrated that outer hair cell apoptosis is an extremely rapid process following exposure to impulse noise (Hu et al., 2005). It is essential to know the physiological mechanisms which conduct to

cell death in order to prevent the damages using therapeutic strategies. These mechanisms remain unclear. In the present study, a maximum of TUNEL-positive outer hair cells has been observed at 3 hours following gunshot noise exposure.

Synaptic vacuolisations were observed following gunshot noise exposure. Pujol et al. have studied the pathophysiology of the glutamatergic synapses of cochlea (Pujol et al., 1993). Glutamate is the known neurotransmitter in the synapses between IHCs and afferent auditory fibers. This neurotransmitter is known to be toxic when it is released in excess. It is the case following an acoustic trauma (Puel et al., 1998). Afferent dendrites are sensitive to the glutamatergic excitotoxicity which conducts to vacuolizations. These vacuolizations may be reversible or can produce an afferent dendrites degeneration (Robertson, 1983). These cochlear structures degeneration might be an important step in acoustic trauma pathophysiology (Robertson, 1983; Spöndlin, 1971). Goulios and Robertson (1983) observed the swelling of afferent dendrites following a continuous noise-induced trauma. They showed that longer duration exposures resulted in more severe swelling of dendrites than short exposures of the same total energy (Goulios and Robertson, 1983). The current study shows that for an extremely short duration exposure (impulse noise), the swelling phenomenon can exist, suggesting a probable glutamatergic excitotoxicity.

References

- Ades, H. W., Trahiotis, C., Kokko-Cunningham, A., Averbuch, A., 1974. Comparison of hearing thresholds and morphological changes in the chinchilla after exposure to 4 kHz tones. *Acta. Otolaryngol.* 78, 192.

- Bohne, B.A., 1976. Mechanisms of noise damage in inner ear. In: Henderson D., Hamernik, R.P., Dosanjh, D.S., Mills, J.H (Eds), Effects of noise on hearing. Raven Press, New York, 41-68
- Bohne, B.A., Harding, G.W., Lee, S.C., 2007. Death pathways in noise-damaged outer hair cells. *Hear. Res.* 223, 61-70.
- Dancer A. 1991. Le traumatisme acoustique. *Médecine/Sciences.* 7: 357-367.
- Goulios, H., Robertson, D., 1983. Noise-induced cochlear damage assessed using electrophysiological and morphological criteria: an examination of the equal energy principle. *Hear. Res.* 11: 327-341.
- Greenwood, D., 1990. A cochlear frequency-position function for several species- 29 years later. *J. Acoust. Soc. Am.* 87 (6), 2592-2605.
- Hamernik R.P., Henderson D., Crossley J.J., Salvi R.J. 1974. Interaction of continuous and impulse noise: audiometric and histological effects. *J. Acoust. Soc. Amer.* 55: 117-121.
- Hamernik, R.P. , Henderson, D., Crossley, J.J, Salvi, R.J., 1974. Interaction of continuous and impulse noise: audiometric and histological effects. *J. Acoust. Soc. Am.* 55, 117-121.
- Henderson, D. H., Hamernik, R. P., Sitler, R. W., 1974. Audiometric and histological changes correlates of exposure to 1 msec noise impulses in the chinchilla. *J. Acoust. Soc. Amer.* 56, 1210.
- Hu, B. H., Guo, W., Wang, P.W., Henderson, D., Jiang, S.C., 2000. Intense noise-induced apoptosis in hair cells of guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol.* 120, 19-24.
- Hu, B. H., Henderson, D., Nicotera, T.M., 2005. Extremely rapid induction of outer hair cell apoptosis in the chinchilla cochlea following exposure to impulse noise. *Hear. Res.* 211, 16-25.

- Hu, B.H., Henderson, D., Nicotera, T.M., 2002. Involvement of apoptosis in progression of cochlear lesion following exposure to intense noise. *Hear. Res.*, 166, 62-71
- Hu, B.H., Henderson, D., Yang, W.P., 2008. The impact of mitochondrial energetic dysfunction of apoptosis in outer hair cells of the cochlea following exposure to intense noise. *Hear. Res.* 236, 11-21.
- Hunter-Duvar, I. M. And Elliot, D. N., 1972. Effects of intense auditory stimulation: hearing losses and inner ear changes in the squirrel monkey. *J. Acoust. Soc. Amer.* 52, 1181.
- Hunter-Duvar, I. M., and Bredberg, G., 1974. Effects of intense auditory stimulation: hearing losses and inner ear changes in the chinchilla. *J. Acoust. Soc. Amer.* 55, 795.
- Luz G.A. 1970. Recovery from temporary threshold shift in monkeys exposed to impulse noise: evidence for a diphasic recovery process. *J. Acoust. Soc. Amer.* 48: 96(A).
- Nicotera, T., Henderson, D., Zheng, X. Y., Ding, D. L., Mc Fadden, S. L., 1999. Reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in noise-exposed cochleas of chinchillas. *Assoc. Res. Otolaryngol.*, 626.
- Nicotera, T.M., Hu, B.H., Henderson, D., 2003. The caspase pathway in noise-induced apoptosis of chinchilla cochlea. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 4, 466-477.
- Nilsson, P., Rydmarker, S., Grenner, J., 1987. Impulse noise and continuous noise of equivalent frequency spectrum and total sound energy. *Acta. Otolaryngol. Suppl.* 441, 45-58.
- Pirvola, U., Xing-Qun, L., Virkkala, J., Saarma, M., Murakata, C., Camoratto, A. M., Walton, K. N., Ylikoski, J., 2000. Rescue of hearing, auditory hair cells and neurons by CEP-1347/KT515, an inhibitor of c-Jun N-terminal Kinase activation. *J. Neurosci.* 20, 43-50.

- Robertson, D., 1983. Functional significance of dendritic swelling after loud sounds in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 9, 263-278.
- Sendowski, I., Raffin, F., Brailon-Cros, A., 2006. Therapeutic efficacy of magnesium after acoustic trauma caused by gunshot noise in guinea pigs. *Act. Oto. Laryngol.* 126, 122-129.
- Slepecky, N., Hamernik, R., Henderson, D., Coling, D., 1981. Correlation of audiometric data with changes in cochlear hair cell stereocilia resulting from impulse noise trauma. *Acta. Otolaryngol.* 93, 329-340.
- Spoendlin, H., 1971. Primary ultrastructural changes in the organ of Corti after acoustic overstimulation. *Acta. Otolaryngol.* 71, 166.
- Van Cruchten, S., Van Den Broeck, W., 2002. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.* 31, 214-223.
- Wang, J., Dib, M., Lenoir, M, Vago, P., Eybalin, M., Hameg, A., Pujol, R., Puel, J., 2002. Riluzole rescues cochlear sensory cells from acoustic trauma in guinea pig. *Neuroscience* 111, 635-648.
- Ward, W. D., and Duval, A. J., 1971. Behavioral and ultrastructural correlates of acoustic trauma. *Ann. Oto-Rhino-Laryngol.* 80, 881.
- Yang, W. P., Henderson, D., Hu, B. H., Nicotera, T. M., 2004. Quantitative analysis of apoptotic and necrotic outer hair cells after exposure to different levels of continuous noise. *Hear. Res.* 196. 69-76.
- Zhao, Y.M., Chen S.S., Cheng, X.R., Li, Y.Q., 2005. Relationship between impulse noise and continuous noise inducing hearing loss by dosimeter measurement in working populations. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi.* 39, 396-399.

Figure captions

Fig 1. Auditory threshold shifts at 20 min and 7 days following exposure to continuous noise or gunshot noise (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

Fig.2 Cochleograms showing the percentage of missing hair cells 14 days following an exposure to continuous noise or gunshot noise .(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

Fig 3. Images of TUNEL staining of the organ of Corti obtained by confocal fluorescent microscopy: (a) Control (without exposure to noise) (b) and (c) 3 hours following gunshot noise exposure.

Fig 4. Cochleograms presenting the number of apoptotic hair cells (TUNEL-positive cells) in function of time following the noise exposure (1h, 3h, 24h and 48h) .(a) following an exposure to gunshot noise (b) following an exposure to continuous noise

Fig 5. Cross-section of basilar part of cochlea, IHC are vacuolated (frame).

Fig 6. Electronmicrographs of gunshot noise damaged cochlea. Ultra-thin sections of the organ, beneath hair cells region. We observed the synaptic button connected to a vacuolated nervous afferent fiber.

Fig 7. Scanning elctronmicrographs of the organ of Corti: gunshot noise exposure.

(a) and (b) without noise exposure.

(c) and (d) 3 hours following gunshot noise.

(e) and (f) 48h following gunshot noise exposure.

(k), (l), (m) and (n) 14 days following gunshot noise exposure

Fig 8. Scanning elctronmicrographs of the organ of Corti: continuous noise exposure

(a) 3h following noise exposure

(b) 48 h following noise exposure: hair abnormalities, fractured at their base

(c) 14 days following noise exposure

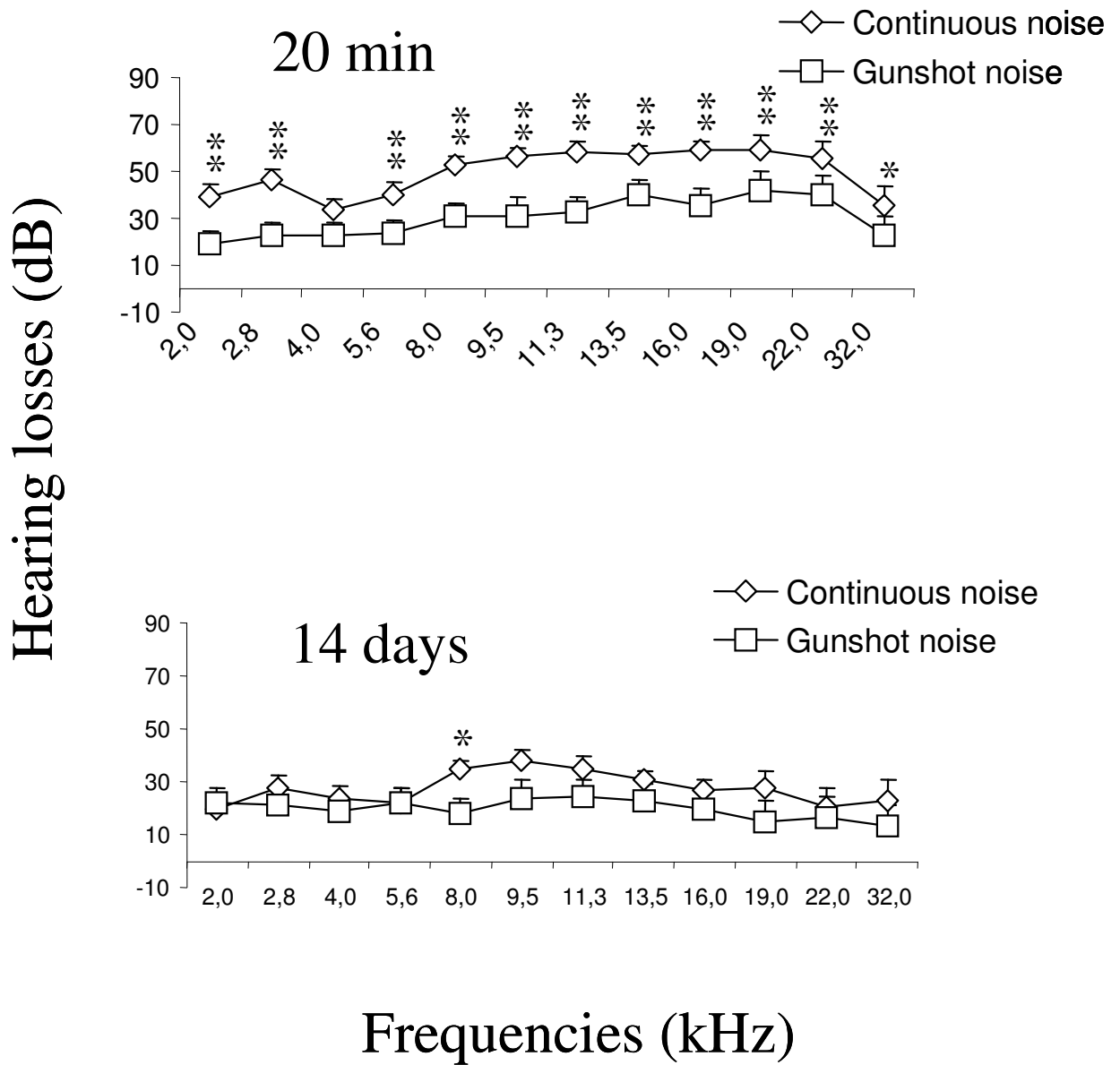


Fig 1. Auditory threshold shifts at 20 min and 14 days following exposure to continuous noise or gunshot noise (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

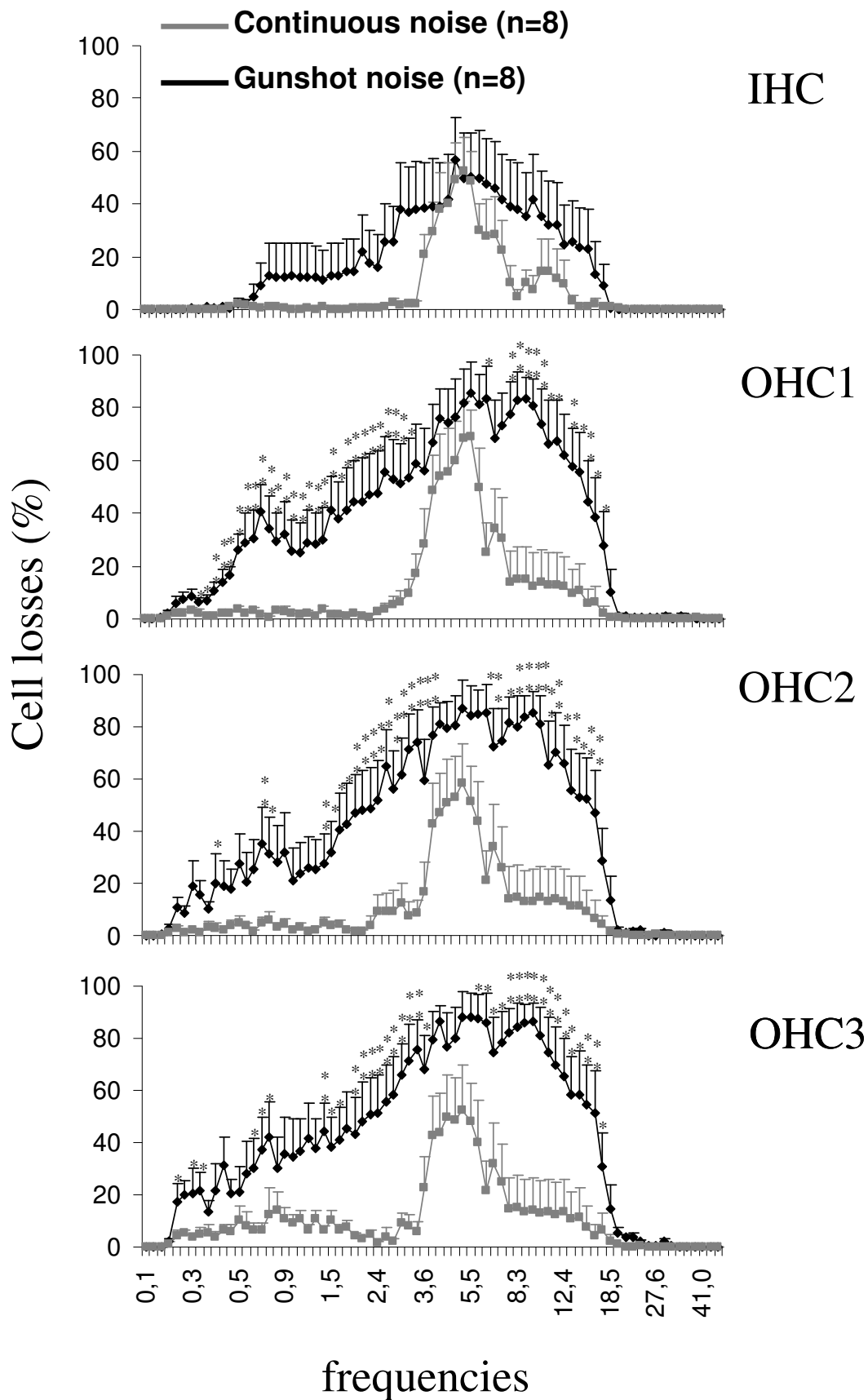


Fig.2 Cochleograms showing the percentage of missing hair cells 14 days following an exposure to continuous noise or gunshot noise. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

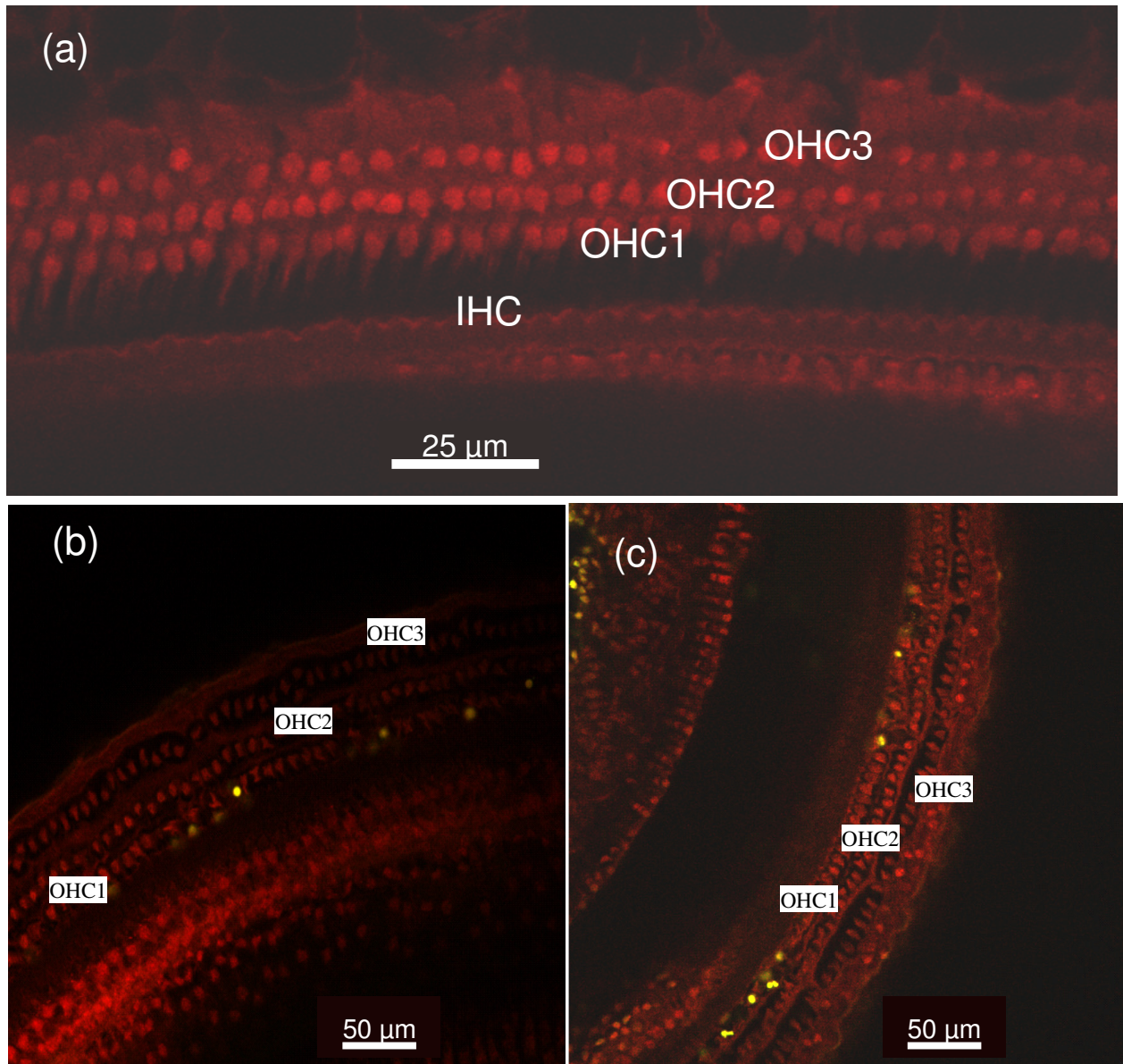


Fig 3. Images of TUNEL staining of the organ of Corti obtained by confocal fluorescent microscopy: (a) Control (without exposure to noise) (b) and (c) 3 hours following gunshot noise exposure.

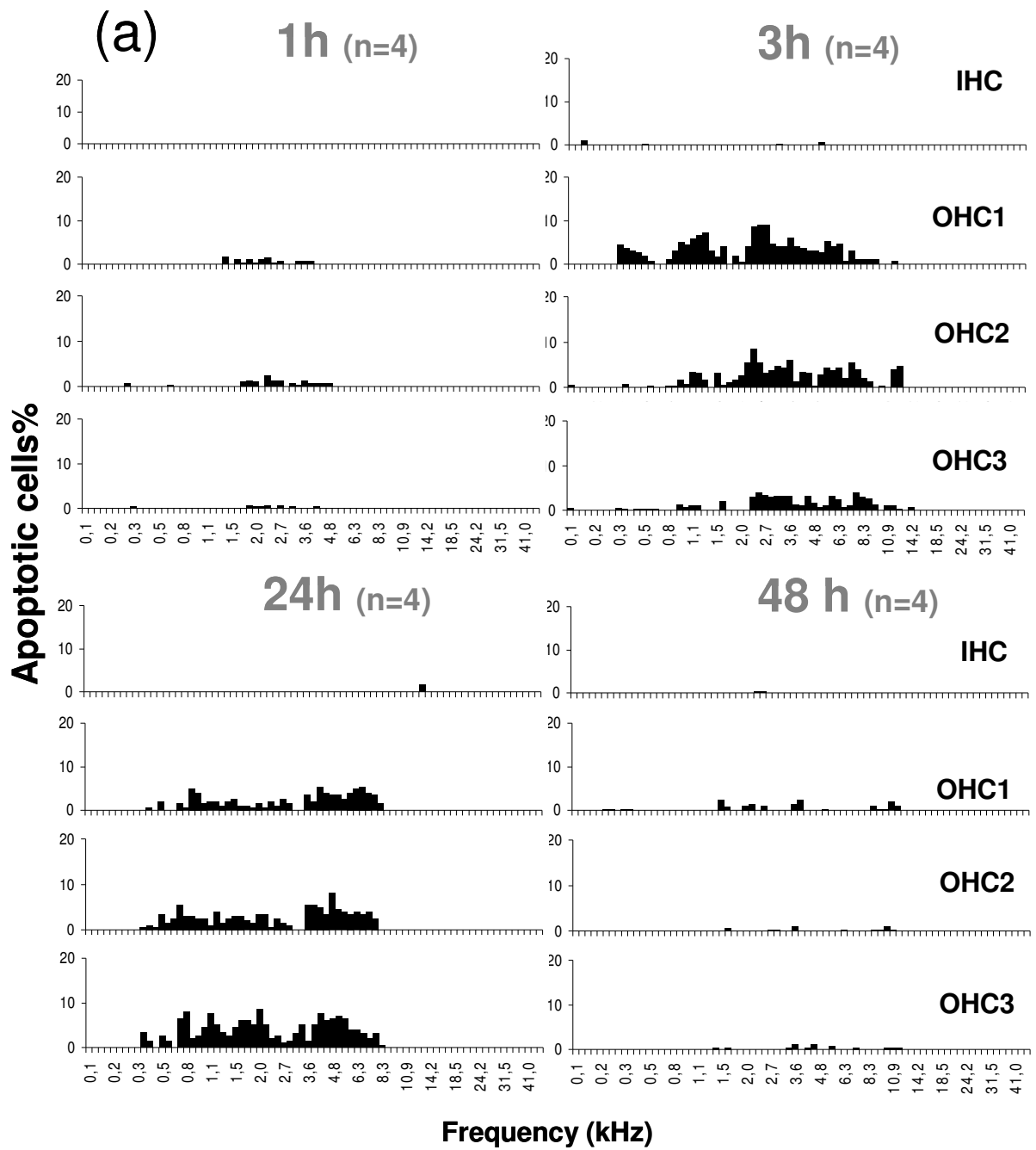


Fig 4a. Cochleograms presenting the number of apoptotic hair cells (TUNEL-positive cells) in function of time following the noise exposure (1h, 3h, 24h and 48h) .(a) following an exposure to gunshot noise (b) following an exposure to continuous noise

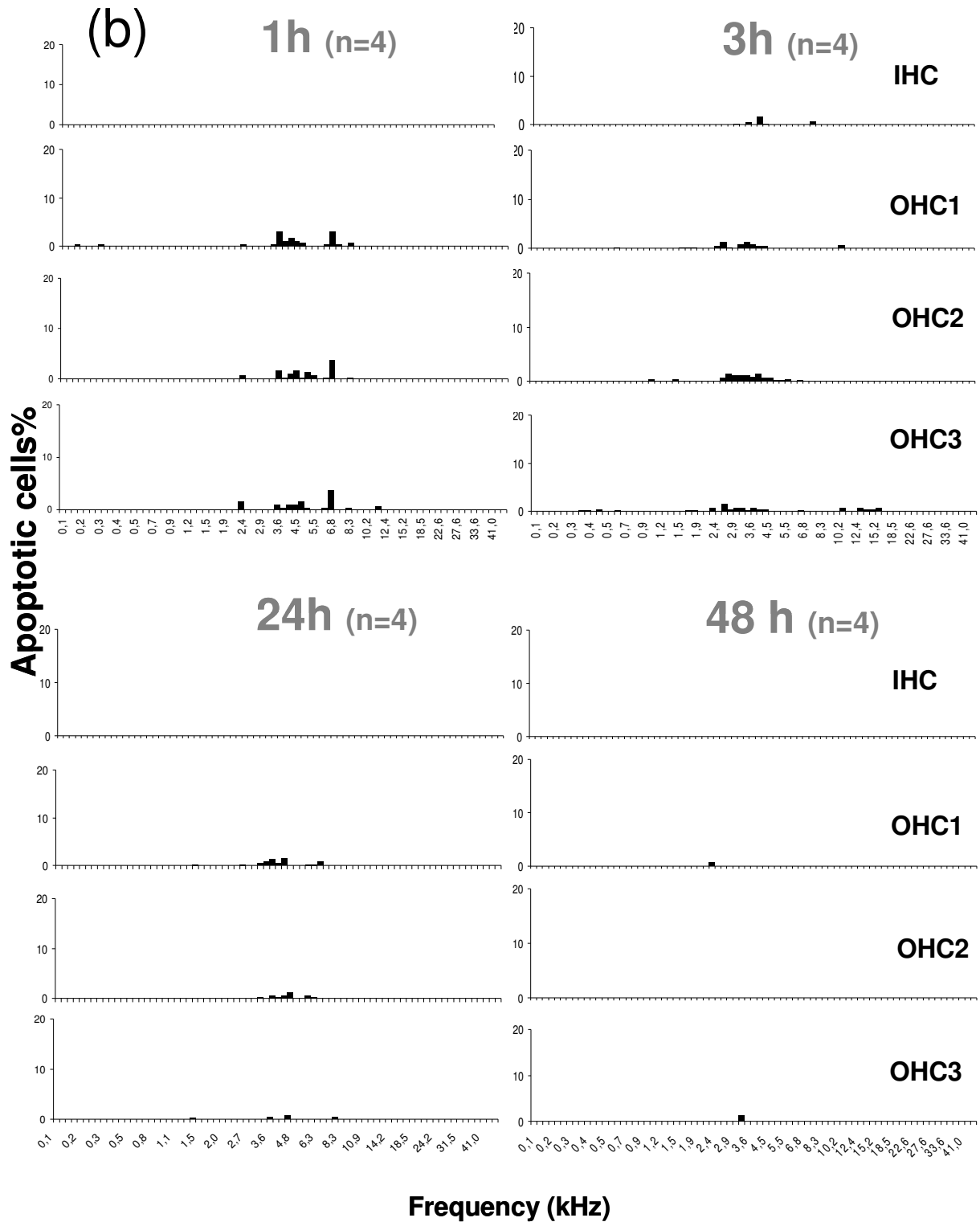


Fig 4b. Cochleograms presenting the number of apoptotic hair cells (TUNEL-positive cells) in function of time following the noise exposure (1h, 3h, 24h and 48h) (a) following an exposure to gunshot noise (b) following an exposure to continuous noise

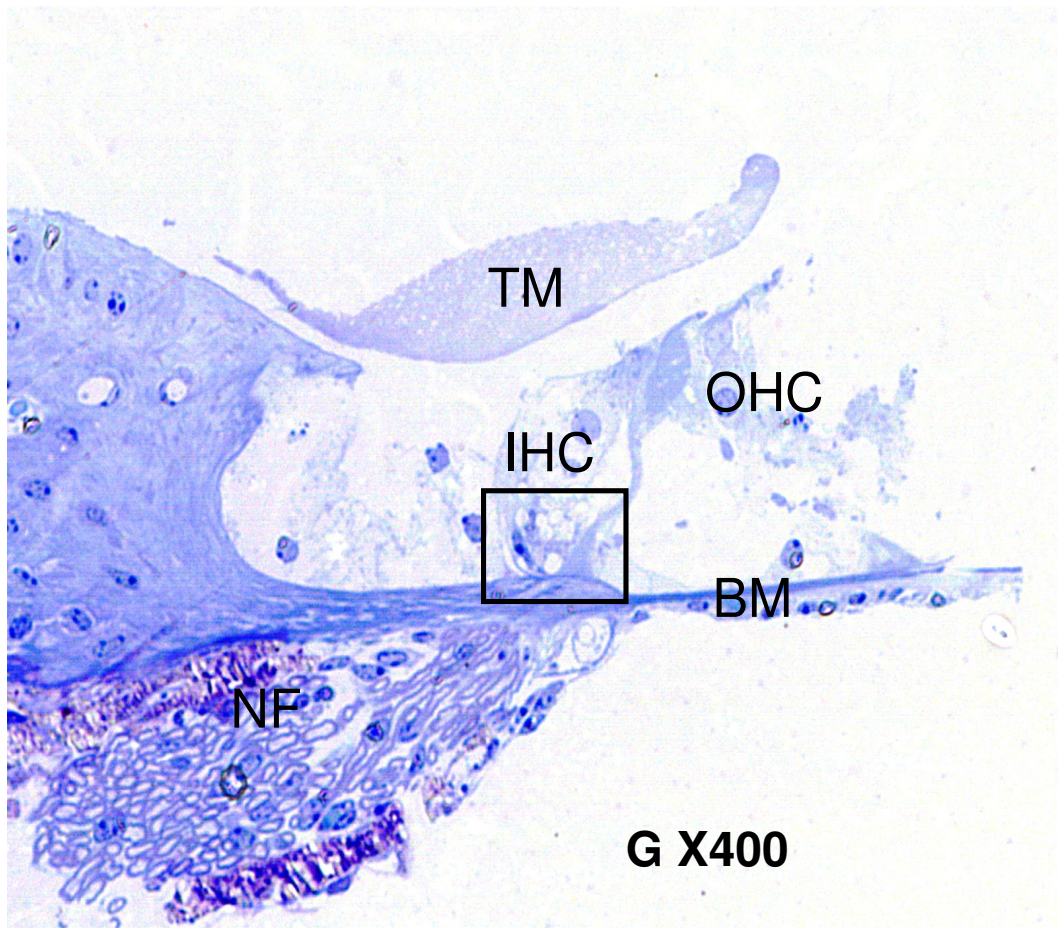


Fig 5. Cross-section of basilar part of cochlea, IHC are vacuolated (frame)
TM: tectorial membrane; NF: nervous fiber; BM: basilar membrane.; IHC: inner hair cell;
OHC: outer hair cell, toluidine blue coloration.

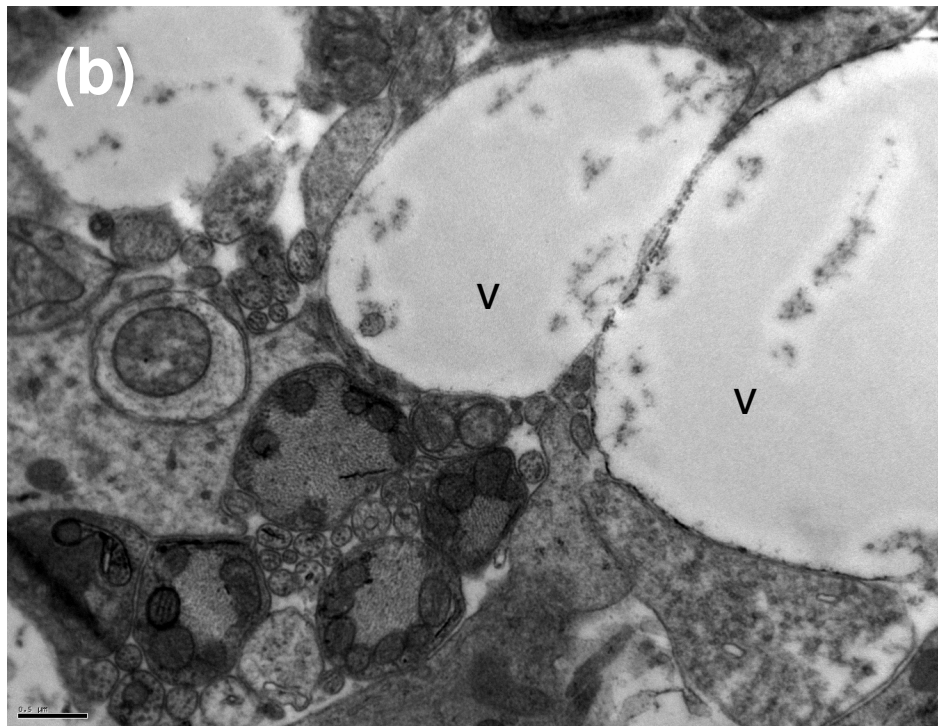
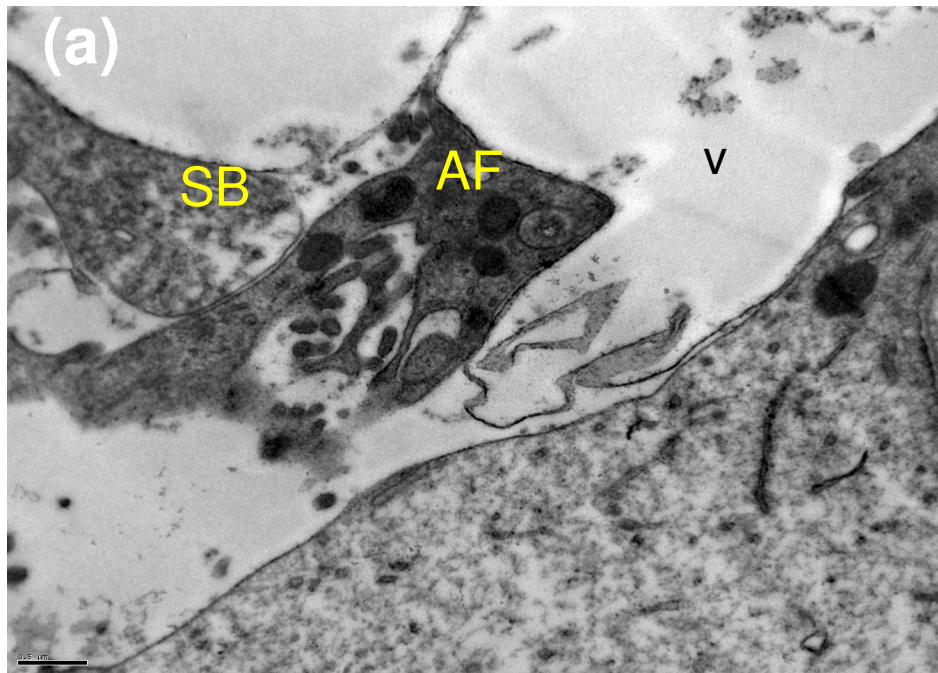


Fig 6. Electronmicrographs of gunshot noise damaged cochlea. (frame) Ultra-thin section of the organ, beneath hair cells region. Large vacuolizations are observed.

(a) and (b) bar = 0.5 μm

SB: synaptic button; AF: afferent fiber V: vacuolization

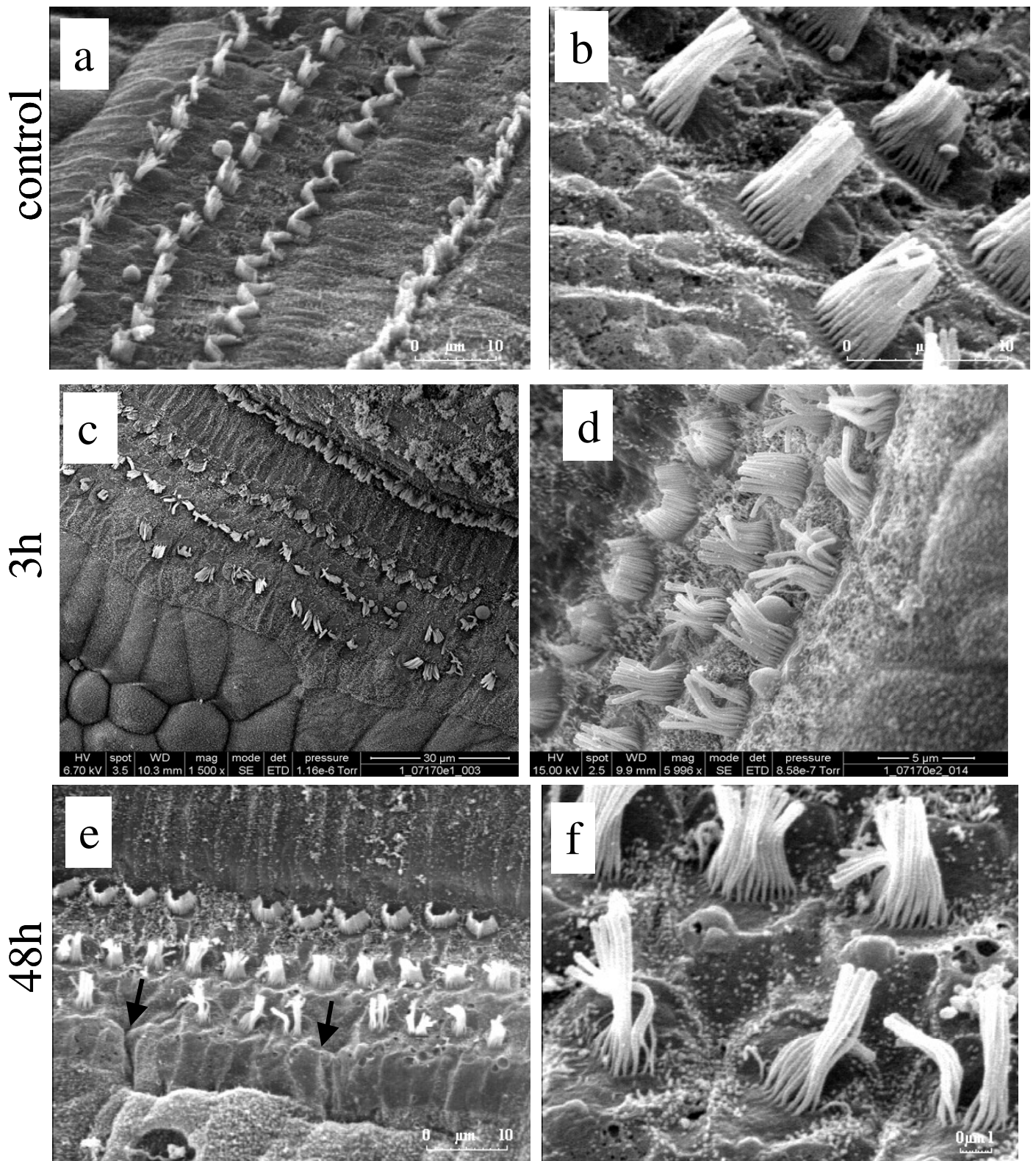


Fig 7. Scanning electronmicrographs of the organ of Corti: gunshot noise exposure.

(a) and (b) without noise exposure: regularity of hairs in each row

(c) and (d) 3 hours following gunshot noise exposure: important bending and separation at the tips and cytoplasmic protusions.

(e) and (f) 48 hours following gunshot noise exposure: disappearance of certain OHCs (arrows) and stereocilia are disarrayed.

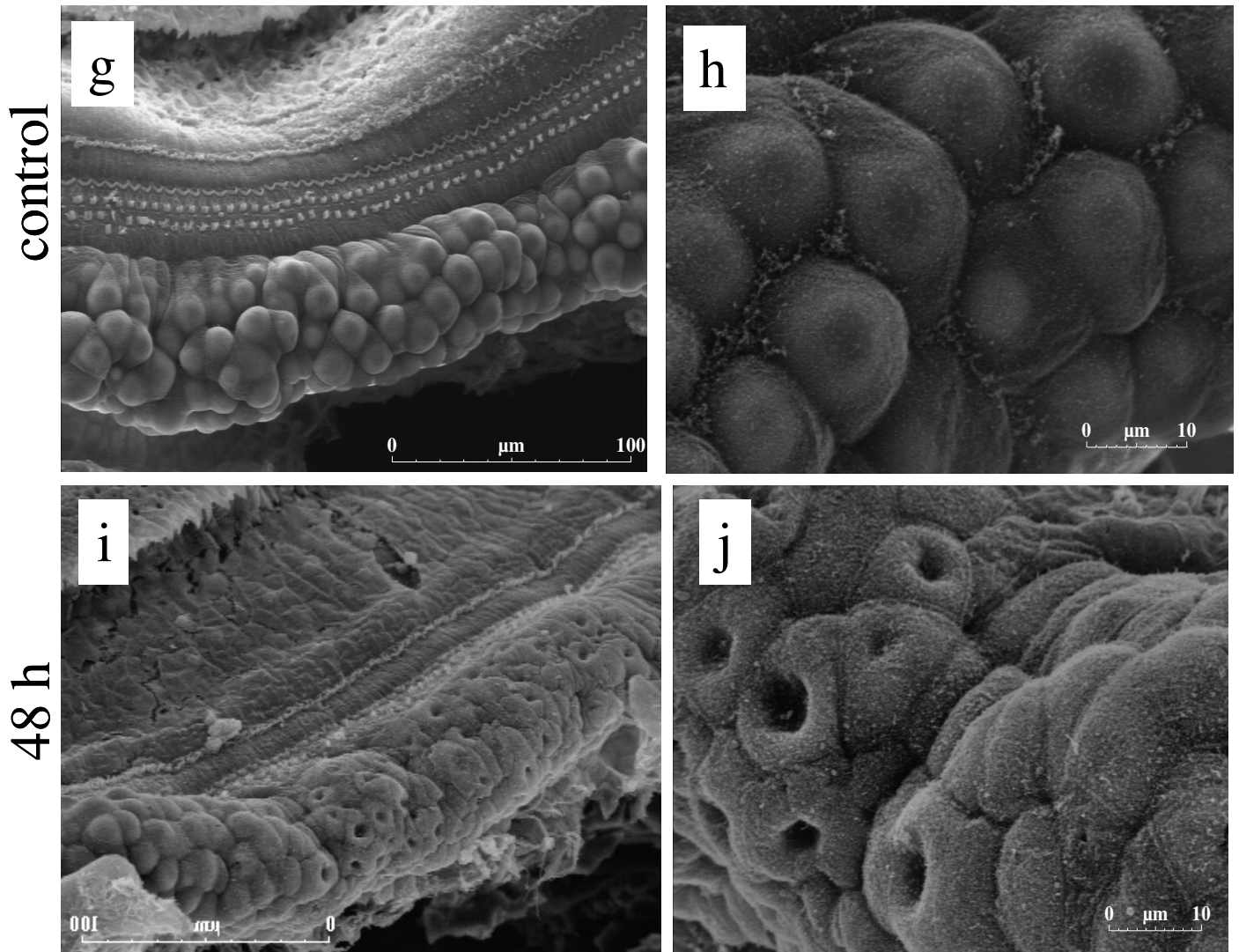


Fig 7. Scanning electronmicrographs of the organ of Corti: gunshot noise exposure.

(g) and (h) Hensen cells without noise exposure: globular appearance

(i) and (j) Hensen cells 48 hours following gunshot noise exposure: large depression, lipids appear to be expelled from the cell.

14 days

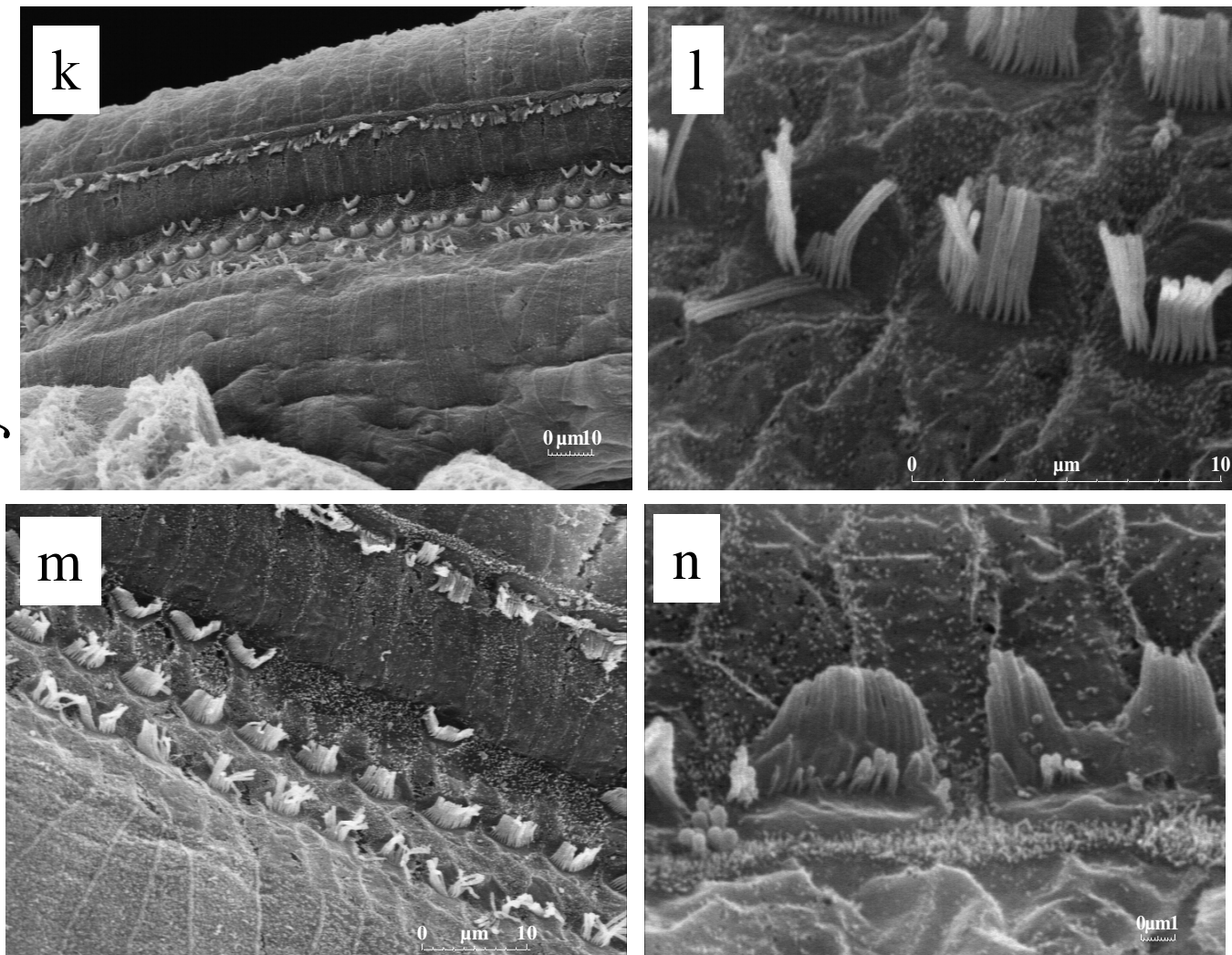
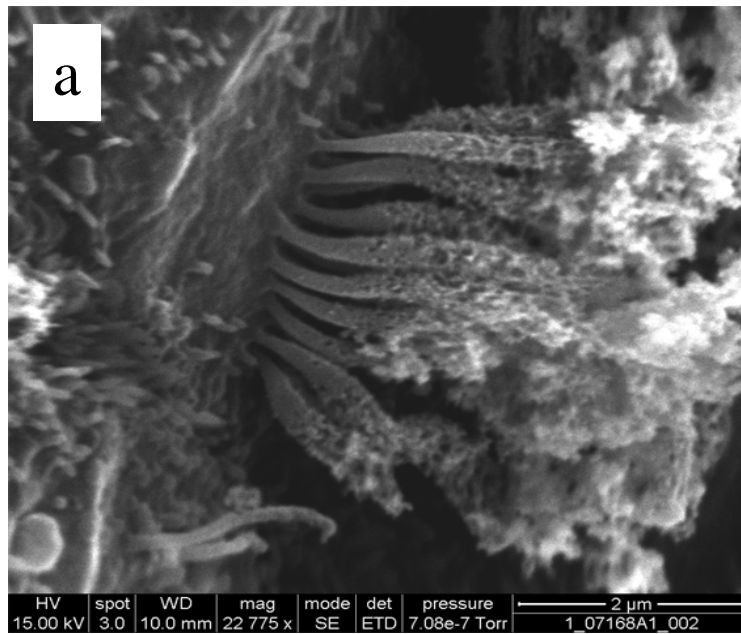
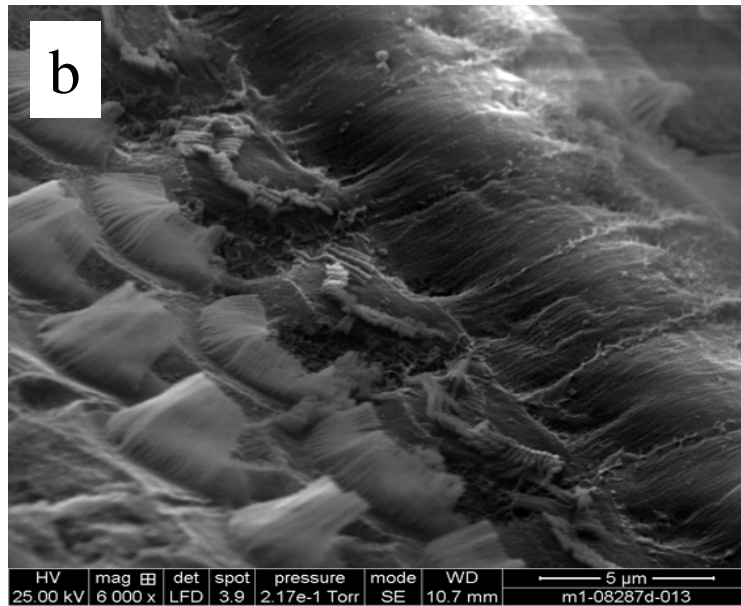


Fig 7. Scanning electronmicrographs of the organ of Corti: gunshot noise exposure. (k), (l), (m) and (n) 14 days following gunshot noise exposure: the missing cells are filled up by large , polygonal, microvillated epithelial cells, complete collapse of the bases of stereocilia are observed.

3 h



48 h



14 days

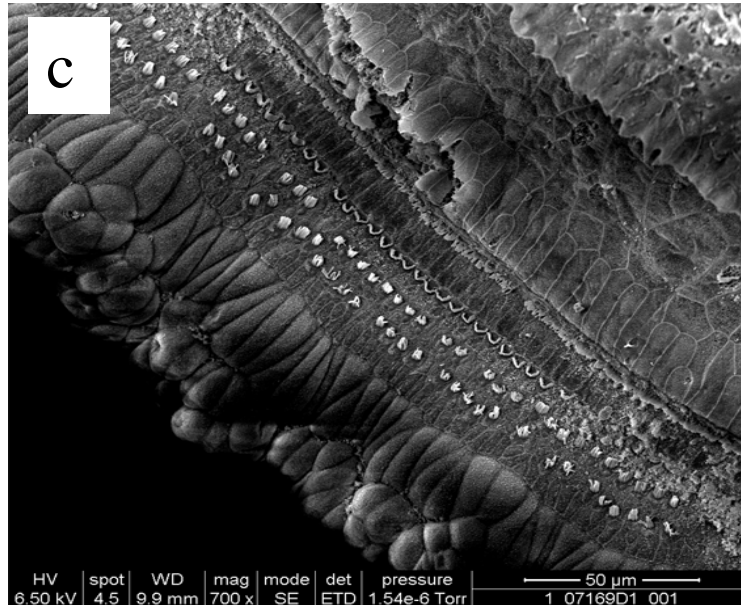


Fig 8. Scanning electronmicrographs of the organ of Corti: continuous noise exposure
(a) 3h following noise exposure
(b) 48 h following noise exposure: hair abnormalities, fractured at their base
(c) 14 days following noise exposure.

PUBLICATION 4

Authors : L. Abaamrane ^a, F. Raffin ^a, S. Schmerber ^b, I. Sendowski ^a

a Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, 24 avenue des maquis du Grésivaudan BP 87. 38702, La Tronche, France.

b Hôpital universitaire de Grenoble, service d'otologie et otoneurologie, BP 217, 38043 Grenoble cedex 09, France

E-mail addresses : L.abaamrane@crssa.net

Fraffin@crssa.net

Sschemerber@chu-grenoble.fr

Isendowski@crssa.net

Title: Intracochlear perfusion of leupeptin and z-VAD-FMK: influence of antiapoptotic agents on gunshot-induced hearing loss.

Corresponding author:

L.Abaamrane

phone: +33 (0)4 76 63 97 75

fax: +33 (0)4 76 63 69 22

e-mail: L.abaamrane@crssa.net

Postal address : CRSSA 24 av. des maquis du Grésivaudan

38702 La Tronche cedex- France

Abbreviations

ABR, auditory brainstem responses

AP, artificial perilymph

dB SPL, decibel sound pressure level

FITC, Fluoresceine Iso Thio Cyanate

IHC, inner hair cell

i.p, intraperitoneal

PI, propidium iodide

NIHL, noise-induced hearing loss

OHC, outer hair cells

SEM, standard error of the mean

TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling

z-VAD-FMK, z-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone

z-DEVD-FMK, z-Asp(Ome)-Glu(Ome)-Val-Asp(OMe)-fluoromethylketone

Abstract

The therapeutic efficacy of cochlear infusion of two anti-apoptotic substances: a potent calpain inhibitor, leupeptin, and a caspase inhibitor, z-VAD-FMK, was evaluated in guinea pigs after a gunshot noise-induced trauma (170 dB SPL). A preliminary study showed that hair cell apoptosis appeared before seven days after the noise trauma. For each animal, one of the cochleae was perfused directly starting 1h after the trauma with leupeptin or z-VAD-FMK for seven days via a mini-osmotic pump whereas the other cochlea was not pump-implanted. ABR threshold shifts were measured over a 14-day recovery period. The functional study of hearing was supplemented by histological analysis. Forty-eight hours after the trauma, significant differences were observed between hearing loss in the z-VAD-FMK-treated and the non-treated ears. Cochleograms showed that hair cell losses were significantly lower in z-VAD-FMK-treated ears. Regarding the leupeptin treatment, hearing losses indicated no significant differences between treated and non-treated ears and cochleograms showed higher hair cell losses in treated ears. This work indicates that early direct infusion of z-VAD-FMK into the cochlea accelerates hearing recovery and reduces hair cell loss after gunshot noise-induced trauma. These results suggest that the gunshot noise-induced trauma may involve the caspase pathway rather than the calpain pathway in the apoptotic process.

1. Introduction

An impulse noise is defined by its high intensity and short duration. Exposure to impulse noise represents an acute acoustic trauma with considerable hazards to hearing capabilities (Henderson and Hamernick, 1986). Gunfire, explosions, firecrackers, jackhammers and drop forges are examples of impulse noise. These types of noise particularly affect military personnel, hunters and victims of terrorist attacks and may involve permanent auditory threshold shifts with associated tinnitus. In France, almost 1200 cases of acute acoustic trauma are reported among military personnel every year (Suc et al., 1994) and the great majority of them occur as a result of firearm use. Systemic corticoid administration is usually the treatment for traumatized subjects. After loud noise exposure, the resulting damage to cochlear cells depends on the type of noise and is of dual origin: mechanical and metabolic. Mechanical damage occurs when the movements of the basilar membrane are excessive, inducing detachment of stereocilia from the tectorial membrane and disconnection of the interciliary links. Metabolic disorders have multiple origins including intracellular influx of potassium or calcium, ischaemia, excessive release of glutamate (excitotoxicity), and production of free radicals in the cochlea. Whatever their origin, these mechanisms can lead to cell death, which may be more or less rapid, and due to necrosis or apoptosis (Yang et al., 2004). While apoptosis is an active process in which cellular structures are systematically disassembled through a process of enzyme-mediated reactions (caspases), necrosis is a passive process in which the cell membrane is damaged, ultimately leading to the loss of cell contents to the surrounding tissues and generating an inflammatory response (Nicotera et al., 2003). Apoptosis has been shown to be the primary cell death pathway in the first day following noise exposure (Hu et al., 2002) and both necrosis and apoptosis may contribute almost equally to sensory cell loss

thereafter (Yang et al., 2004). Recent studies have tested the protective ability of a wide variety of compounds against noise-induced hearing loss (NIHL). Antioxidants, growth factors, calcium antagonists and antiapoptotics have been tested using different administration routes including intraperitoneal (ip), oral, or direct infusion into the the cochlea through the round window membrane (Ohlemiller, 2008). These previous studies allowed us to focus on therapeutic strategies designed to protect the cochlea against the noise from gunfire and particularly on strategies based on the inhibition of regulators or executors of apoptotic sensory hair cell death pathways. The use of antiapoptotic agents, directly infused into the cochlea, may therefore be effective in treating inner ear damage following gunshot noise exposure in order to prevent permanent hearing loss. Local application allows for a target effect of substances, and this administration route is safe and can be used in humans (Jackson and Silverstein, 2002).

Among antiapoptotic agents, leupeptin and z-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone (z-VAD-FMK) are therapeutically interesting. Leupeptin is a potent calpain inhibitor. Calpains are a family of calcium-activated proteases which promote the breakdown of cellular proteins, kinases, phosphatases and transcription factors. These processes lead to apoptosis. The treatment of cochlear hair cells with leupeptin was found to be effective against acoustic trauma. For example, leupeptin protected sensory hair cells in the chinchilla following continuous noise exposure (48 h to an octave-band noise centered at 4 kHz at 100 or 105 dB SPL, Wang et al., 1999). Apoptotic hair cell death in the noise-damaged cochlea was found to be associated with caspase-3 activation. An intracochlear perfusion of the caspase-3 inhibitor z-DEVD-FMK (z-Asp(Ome)-Glu(Ome)-Val-Asp(OMe)-fluoromethylketone) prevented noise-induced F-actin cleavage in the outer hair cells of chinchilla cochleae (Hu et al., 2002). The general caspase inhibitor z-VAD-FMK was also found to be effective against gentamicin-

induced cochlear damage (Okuda et al., 2005). However, most of these studies were conducted after acoustic trauma resulting from continuous noise exposure. The anti-apoptotic efficacy studies following impulse noise exposure and particularly gunshot noise exposure remain rare. Recently, Coleman et al. (2007) tested a JNK mediated apoptosis inhibitor, AM-111, following impulse noise exposure (155 dB peak SPL simulating M-16 rifle fire). The authors found that AM-111 significantly protected hair cells against permanent hearing loss (Coleman et al., 2007).

The goal of the present study was to detect gunshot noise-induced apoptosis and test the efficacy of the previously described antiapoptotic agents, leupeptin and z-VAD-FMK, infused intracochlearly following gunshot noise exposure in guinea pigs.

2. Material and methods

Sixty albino guinea pigs (400-600 g, Charles River France, Chatillon-sur-Chalaronne, France) with a normal Preyer reflex were used in this study. The study protocol was approved by the local animal care and use committee (2007/19.0; 2008/26.0).

2.1 General protocol

Before testing treatment efficacy, the delay in apoptosis was assessed using the TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling) method. Further, preliminary studies were conducted to verify the harmlessness of mini-osmotic pump implantation and to determine drug concentration. For treatments, auditory thresholds were estimated by auditory brainstem response measurements (ABR) under mild anaesthetic [ketamine chlorhydrate 40 mg/ml (Imalgène®) with

medetomidine 10 mg/kg i.p (Domitor[®])] before noise exposure. Only animals with similar thresholds in the right and left ears were studied. Anesthetized guinea pigs were then exposed to the gunshot noise and a mini-osmotic pump filled with antiapoptotic substance was rapidly implanted in one of the cochleae, the other being non-implanted and used as control (more complete details are presented below). The threshold shifts on each ears were studied at 48 hours, seven days and 14 days after noise exposure. At the end of the experiment, the animals were sacrificed and the cochleae prepared for histological analysis.

2.2 Detection and quantification of apoptosis: TUNEL assay

TUNEL was used to identify DNA fragments in apoptotic cells (Heatwole, 1999).

The animals were sacrificed at a defined time after noise exposure, i.e., at either 1, 3, 24 or 48 h, or seven or 14 days using deep anaesthesia by injection (i.p) of pentobarbital sodium (Dolethal[®], 500mg/kg), and the cochlea were quickly removed. The cochleae were fixed with 4% paraformaldehyde and the organs of Corti were dissected from the cochleae. The In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein was used to measure and quantify cell death (apoptosis) by labeling and detection of DNA fragmentation (Roche Diagnostics, Meylan, France). The number of DNA strand breaks in apoptotic cells is typically so large that the degree of cell labeling in this assay is an adequate discriminator between apoptotic and necrotic cells. The organs of Corti were incubated over night in ice-cold 70 % ethanol. The membranes were permeabilized with proteinase K (20 µg/ml) at room temperature for 5 min. The tissues were incubated in the freshly prepared DNA-labeling solution containing TdT enzyme (terminal transferase) and fluorescein-dUTP for 2 hours at 37 °C. The organs of Corti

were double stained with propidium iodide (PI at 10 $\mu\text{g/ml}$) at room temperature for 10 min. After rinsing in PBS (phosphate buffer saline solution), the organs of Corti were mounted on slides containing antifade medium (Slowfade Light Antifade kit, Molecular probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Thanks to fluorescein isothiocyanate (FITC) derivative, incorporated nucleotides were visualized using a confocal fluorescence microscope (LSM 710, Zeiss, Le Pecq, France). The TUNEL-labeled hair cells (green fluorescent cells) were counted in 0.25-mm sections using the fluorescence microscope, making it possible to construct a cochleogram, which provided the percentage of TUNEL-positive hair cells as a function of the distance from the apex. This measure was then converted into a frequency map using Greenwood's (1990) model adapted for guinea pigs. Percentages of TUNEL-positive hair cells in each 0.25 mm length of tissue were plotted along the cochlear length as a cytocochleogram.

2.2 Preliminary study: therapeutic substance tested

An artificial perilymph solution (AP: 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 10 mM Hepes; 11 mM glucose; pH adjusted to 7.4) was tested alone for auditory function in the absence of acoustic trauma in order to validate our surgical protocol. Several concentrations of leupeptin (1mg/ml and 500 $\mu\text{g/ml}$) (Fluka, Sigma, Saint-Louis, MO USA) and z-VAD-FMK (Sigma, Saint-Louis, MO USA) (250, 100 and 50 μM) were tested for their effect on auditory function in the absence of acoustic trauma to determine a non-ototoxic concentration to the animal. The two substances were diluted in artificial perilymph (AP) and administered for seven days using a mini-

osmotic pump (see details below). ABR thresholds were measured before and at 48 h and 7 and 14 days after pump implantation.

2.3 Drug infusion

Mini-osmotic pumps (Alzet pumps, Model 2001, reservoir volume 200 μ l; Durect Corp., Cupertino, CA, USA) connected to a catheter were used to introduce substances into the cochlea. The mini-pumps were filled with 200 μ l of AP, leupeptin or z-VAD-FMK under sterile conditions. A miniature glass pipette with a ring of glue placed near the tip to provide a leak-proof seal against the cochlea, was connected to the catheter. The pipette and the catheter were then filled and connected to the pump's flow moderator. The mini-pump flow rate was 1 μ l/h with the entire contents being delivered over 7 days. Before surgery, the pump was incubated in sterile saline solution at 37°C for 12 hours so that diffusion started immediately after implantation.

2.4 Sound trauma and surgical procedure

Before noise exposure and surgery, the animals were anaesthetised with an i.p injection of tiletamine/zolazepam (Zoletil[®] 100, Virbac; 100 mg/kg) combined with xylazine (Rompun[®] 2%; Bayer Pharma; 3 mg/kg). Before implantation of the pump, the animals were exposed to three blank gunshot from a FAMAS F1 rifle in an anechoic room. Each guinea pig was placed in a hammock 60 cm from the barrel of the gun, corresponding to 170 dB SPL (peak value). A 1/8-in condenser microphone membrane (type 4321, Bruel & Kjaer, Naerum Denmark), was placed parallel to the eardrum of the animal, provided an estimate of noise perceived in the ear. The signal was

amplified and conditioned (model, NEXUS, Bruel & Kjaer, Naerum Denmark) and recorded on a data-acquisition system (OD200-10, Odyssey system) at 10 MS/s.

Just after the gunshot noise exposure, the animals were prepared for surgical implantation of the pump to deliver the studied substances. The rectal temperature was maintained at $38 \pm 1^\circ\text{C}$. Alternately, the left or right bulla was exposed and opened under sterile conditions. The tip of the perfusion pipette was inserted into a 0.15 mm hole which had been drilled close to the round window in the basal turn of the cochlea. Dental cement was used to secure the tubing connected to the pump and to close the bulla. The osmotic mini-pump was inserted into a pocket under the skin on the animal's back.

2.5 Audiometry

The auditory thresholds were determined by ABR under mild anesthetic (Ketamine 40 mg/kg with medetomidine hydrochloride 10mg/kg i.p). The animal's body temperature was maintained at $38 \pm 1^\circ\text{C}$. Responses to six frequencies at 2, 4, 8, 16, 19 and 22 kHz were recorded using subcutaneous stainless steel needle electrodes. The potential difference was measured between an electrode on the vertex and an electrode behind the ipsilateral ear, with a neck electrode serving as ground. The equipment used to generate the sound stimuli and record the ABR included two microprocessors and a programmable attenuator (System 3; Tucker-Davis Technologies; Gainesville FL USA). The sound stimuli consisted of pure tonebursts (duration=13 ms, rise/fall times=1.5 ms), presented 15 /s which ranged from 0 to 90 dB SPL in 5 dB steps. The sound was delivered by an earphone (type Px 100, Sennheiser, Germany) placed nearby the outer ear canal. Cochlear responses were amplified ($\times 100,000$) by a differential amplifier

(GRASS RPS107; Astromed; Trappes; France), filtered (0.1 Hz-3 kHz), averaged (1024 samples) and stored in a Pentium-based personal computer. The threshold was defined as the intensity in dB SPL needed to elicit a measurable response, consistent with responses observed at higher intensities. Threshold shifts were calculated at each time relative to control values, i.e, before acoustic trauma.

2.6 Histological analysis of the cochlea

The animals were sacrificed at the end of the experiment following the deep anesthesia described above, and the cochleae quickly removed. A solution of succinate dehydrogenase containing 2.5 ml of 0.2 M sodium succinate, 2.5 ml of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.6) and 5 ml of 0.1 % tetranitro blue tetrazolium was infused through the round and oval windows of the cochlea. The cochleae were placed in this solution at 37°C for 2 hours and then fixed in 4% paraformaldehyde for more than 24 hours. They were dissected under a binocular microscope to remove the organ of Corti from the apex to the base. The samples, mounted in glycerine on a histological slide, were observed under blinded conditions under an optical microscope ($\times 400$). The missing outer hair cells (OHCs) and inner hair cells (IHCs) were counted in 0.25-mm segments, making it possible to construct a fairly complete cochleogram, which provided the percentage of destroyed cells as a function of the distance from the apex. The irregular four first portions at the apex, i.e., < 1 mm were excluded from the count. These data were then converted into a response frequency using Greenwood's (1990) model, adapted for guinea pigs. Percentages of hair cell loss for each 0.25 mm length of tissue were plotted along the cochlear length for each cochlea, to obtain overall hair cell losses.

2.7 Statistical method

The results were compared between the treated ears (pump-implanted) and non-treated ears (non implanted) and were presented as means \pm sem.

The significance of the differences between thresholds shifts was evaluated using one-way ANOVA followed by an LSD-Fisher post hoc test. The same test was performed for hair cell losses. STATISTICA (Statsoft, Tulsa, Okla., USA) was used for these statistical analyses. The null hypothesis was rejected at $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Detection and quantification of apoptosis

The appearance of apoptotic hair cells presented a maximum at 3 hours after gunshot noise exposure. Average cytochleograms are presented Figure 1. The number of TUNEL-positive hair cells reached a maximum of 10 % on the first row of OHCs (OHC1) 3 hours post exposure (Fig. 1b). At 24 and 48 h following gunshot noise exposure, the number of TUNEL-positive OHCs decreased and disappeared totally at seven and 14 days after the trauma (data not shown). A representative fluorescent microscopic image of the TUNEL staining of the organ of Corti 3 hours after gunshot noise exposure is presented in Figure 2. Three hours after gunshot noise exposure, some TUNEL-positive OHCs were present as shown in Fig 2b and c.

These results confirmed that apoptotic hair cells appeared early after gunshot noise exposure. The overall emergence window of apoptosis was between 1 and 48 h with a maximum between 3-24 h postexposure. Thus, to obtain effective anti-apoptotic

treatment, animals must be treated early following noise exposure and a seven-day period of treatment seems to be sufficient.

3.2 Preliminary study (data not shown)

The preliminary study evaluated the influence of a local infusion of AP on ABR thresholds. Seven days after implantation, auditory thresholds measured in AP- infused ears did not differ significantly from those in non-implanted ears.

Leupeptin, at a concentration of 1mg/ml, was non-ototoxic without noise exposure in that ABR thresholds measured in treated ears. Thus, this concentration was used in the primary experiments.

In contrast, z-VAD-FMK, at a concentration of 100 or 250 μ M, was ototoxic in the absence of noise exposure in that ABR thresholds measured in treated ears. As z-VAD-FMK at a concentration of 50 μ M administered alone was not ototoxic, this concentration was used experimentally.

3.3 Noise-induced hearing loss

3.3.1 Treatment with leupeptin

Figure 3 shows the evolution of hearing loss over time from 2-14 days postexposure for infused (black bars, n=12) and non-infused (shaded bars, n=12) at each test frequency. No significant differences between the two groups was observed over time. Thus, leupeptin did not influence the effects of intense gunshots on NIHL.

3.3.2 Treatment with z-VAD-FMK

Figure 4 shows the evolution of hearing loss over time from 2-14 days post-trauma for implanted and non implanted ears (n=18) at each frequency. Differences from corresponding control values appeared 2 days after noise exposure for 8, 16, 19 and 22 kHz ($p < 0.01$). For example, at 16 kHz, hearing loss was 27 dB (sem= 4 dB) in treated ears versus 44 dB (sem= 4 dB) in non-treated ears. After 7 and 14 days recovery, the differences between groups decreased with no significant differences observed between z-VAD-FMK-treated and non-treated ears.

3.4 Hair cell losses

3.4.1 Treatment with leupeptin

Figure 5 shows the average hair cell loss as a function of frequency. From the cochleograms, it can be noted that there were significantly more cell losses for the 8-20 kHz range of frequencies for treated ears in OHCs ($p < 0.01$ or $p < 0.05$) corresponding to the basal region of the cochlea. For other frequencies, no significant difference between treated and non-treated ears was observed. In IHCs, cell losses were globally lower but in the region of seven test frequencies, the number of cell losses were significantly higher for treated ears.

3.4.2 Treatment with z-VAD-FMK

Figure 6 shows the mean hair cell loss as a function of frequency. It can be noted that there were significantly fewer cell losses in z-VAD-FMK-treated ears (black line) in the 3-12 kHz frequencies for all rows of hair cells. For example, at 8.3 kHz, the percentage of missing cells was 39 % (sem= 17 dB) in non-treated ears versus 5 % (sem= 4 dB) in treated ears for the IHCs ($p<0.01$) and 83 % (sem 14) in non-treated ears versus 46.5 % (sem 15) in treated ears for OHC1 range ($p<0.01$). However, the efficacy of z-VAD-FMK on hair cell loss was variable among animals as indicated by the high SEM values. For example, Fig 7 shows the two individual cochleograms (left implanted, right non-implanted ear) for the same animal. For this subject, hair cell survival was particularly well preserved by treatment with z-VAD-FMK.

4. Discussion

The most significant finding in this study was that the caspase inhibitor accelerated hearing recovery and reduced hair cell loss following gunshot noise exposure whereas the calpain inhibitor had no positive therapeutic effect on auditory function or on hair cell survival.

In a previous study, we reported a safe method for administering drugs into the inner ears of guinea pigs without causing damage (Sendowski et al., 2006). In the present study, local cochlear infusion of the substances was used. Local administration ensures freedom from systemic effects and allows lower concentrations to be used. This route provides a direct access to the cochlea bypassing the hematocochlear barrier. Moreover, this method of administration minimizes the important variation in

susceptibility resulting from impulse noise-induced trauma, because each animal is its own control. Nevertheless, this method could generate variability in treatment efficacy. Because of the cochlear aqueduct, the concentration gradient within the cochlea might be irregular, which could then limit treatment efficacy for apical structures (Livingston et al., 2009).

After a repetitive impulse noise-induced trauma, apoptosis was found to be an extremely rapid process (5 minutes after the end of exposure) (Hu et al., 2005) and continued to emerge for several days following noise exposure (Yang et al., 2004). In the traumatized cochlea, several apoptotic events were identified (Nicotera et al., 2003). Apoptosis is a tightly controlled cell death process, requiring the participation of a cascade of signal transductions and the interaction of multiple apoptotic molecules. This process is induced by at least two major pathways: death receptors exemplified by Fas-mediated caspase 8 activation and the mitochondria-mediated caspase 9 activation pathway (Xiang et al., 1996; Budihardjo et al., 1999). The caspase pathway has been well documented during the last few years. Many studies have indicated that caspase pathway involvement in intense sound-induced apoptosis (Wang et al., 2002; Nicotera et al., 2003; Niu et al., 2003). Recently, Hu et al. (2009) have studied apoptosis-related genes in the cochlea of noise-exposed rats in order to further investigate noise-induced apoptotic activity. Another apoptotic pathway has also been documented: the calpain pathway. Calpain, which is a calcium-dependent cysteine protease, is activated when intracellular calcium levels increase and its activation leads to the breakdown of cellular proteins (Sorimachi 2000; Hata et al., 2001). Together these studies suggest a therapeutic application of anti-apoptotic substances such as calpain or caspase inhibitors.

In the present study, apoptosis staining experiments (TUNEL labeling) showed that hair cell death appeared during first few hours following a gunshot noise exposure with a maximum occurrence between 3 and 24 hours. This delay in occurrence is consistent with the results obtained by Hu et al. (2005) following repetitive impulse noise trauma. Therefore, a treatment based on the intracochlear infusion of anti-apoptotic substances was tested following the trauma, i.e., 1 h postexposure, which represented the time for surgical intervention to implant the micro-osmotic pump.

Leupeptin is a common calpain inhibitor and has been shown to inhibit programmed cell death in other cells (Montenez et al., 1994). Regarding the inner ear, leupeptin was shown by other investigators to protect cochlear hair cells from acoustic overstimulation (Salvi et al., 1998; Wang et al., 1999) and neurotrophin-withdrawal (Cheng et al., 1999). In the present study, leupeptin had no significant effect on rescuing auditory dysfunction. That is, measured hearing loss was not significantly different between treated and non-treated ears. Moreover, with respect to hair cell loss, leupeptin-treated ears at 1mg/ml displayed higher cell losses compared with non-treated ears, with a significant difference in the cochlear regions corresponding to high frequencies. Because leupeptin did not influence NIHL, it suggests that the calpain pathway is not involved in a gunshot-induced trauma. However, Wang et al. (1999) observed that leupeptin protected cochlear hair cells from acoustic overstimulation at the same concentration of 1mg/ml with a noise trauma consisting of exposure to 100 or 105 dB at 4 kHz over 48 h (Wang et al., 1999). These contrasting results suggest that the apoptotic pathways involved in continuous noise-induced trauma or gunshot-noise induced trauma may be different.

The mechanisms by which hair cell loss was higher in leupeptin treated ears remain unclear. Wang et al. (1999) did not notice higher cell loss using leupeptin treatment;

indeed the authors used chinchillas as animal models in their study suggesting possibly different susceptibilities between animal models, i.e., between chinchillas and the present guinea pigs.

In contrast, in the present study, the general caspase inhibitor z-VAD-FMK was used to prevent apoptosis resulting from gunshot noise trauma. By two days after gunshot noise exposure, z-VAD-FMK treated ears displayed significantly lower hearing loss at high frequencies (8, 16, 19 and 22 kHz). After 7 and 14 days of recovery, hearing loss was equivalent in treated and non-treated ears. This result suggests that the caspase inhibitor may only accelerate hearing recovery during the immediate post-traumatic period. Faster recovery has been already reported after NIHL for other treatments such as methylprednisolone (Sendowski et al., 2006; Abaamrane et al., 2009). Cochleograms indicated that the caspase inhibitor significantly preserved hair cell survival. However, this preservation remained moderate, on average. Because the treatment was particularly effective in some animals, further experiments aimed at optimizing the cochlear perfusion of z-VAD-FMK are indicated.

In conclusion, the present study demonstrated for the first time that intracochlear administration of z-VAD-FMK continuously for 7 days following gunshot noise trauma, accelerates hearing recovery and preserves hair cells from death. However, the calpain inhibitor, leupeptin, was not effective in our trauma model. These results suggest that one of the early steps in gunshot noise-induced trauma may involve the caspase rather than the calpain pathway. Caspase inhibitors are, therefore, potential candidates for new therapeutic agents to limit noise-induced hair loss. The present study confirms the need to administer pharmacological treatment early after a traumatic noise over-exposure.

References

- Abaamrane, L., Raffin, F., Gal, M., Avan P., Sendowski, I. 2009. Long-term administration of magnesium after acoustic trauma caused by gunshot noise in guinea pigs. *Hear. Res.* 247, 137-145.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 269-290.
- Cheng, A. G., Huang, T., Stracher., A., Kim. A., Liu, W., Malgrange, B., Lefebvre, P.P., Shulman, A., Van de Water, T.R. 1999. Calpain inhibitors protects auditory sensory cells from hypoxia and neurotrophin-withdrawal induced apoptosis. *Brain Res.*, 850, 234-243.
- Coleman, J. K. M., Littlesunday, C., Jackson, R., Meyer, T. 2007. AM-111 protect against permanent hearing loss from impulse noise trauma. *Hear. Res.* 226, 70-78.
- Greenwood, D., 1990. A cochlear frequency-position function for several species- 29 years later. *J. Acoust. Soc. Am.* 87, 2592-2605.
- Hata, S., Sorimachi, H., Suzuki, K. 2001. Structure and function of calpain superfamily. *Seikagaku*, 73, 1129-1140.
- Heatwole, V. M. 1999. TUNEL assay for apoptotic cells. *Methods Mol. Biol.* 115, 141-148.
- Henderson, D., Hamernik, R.P. 1986. Impulse noise: critical review. *J. Acoust. Soc. Am.* 80, 569-584.
- Hu, B.H., Henderson, D., Nicotera, T.M., 2002. Involvement of apoptosis in progression of cochlear lesion following exposure to intense noise. *Hear. Res.*, 166, 62-71.

- Hu, B. H., Henderson, D., Nicotera, T.M. 2005. Extremely rapid induction of outer hair cell apoptosis in the chinchilla cochlea following exposure to impulse noise. *Hear. Res.* 211, 16-25.
- Hu, B. H., Cai, Q., Manohar, S., Jiang, H., Ding, D., Coling, D. E., Zheng, G., Salvi, R. 2009. Differential expression of apoptosis-related genes in the cochlea of noise-exposed rats. *Neurosciences.* 161, 915-925.
- Jackson, L. E., Silverstein, H. 2002. Chemical perfusion of the inner ear. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 35, 639-653.
- Livingston, W.J., Zhu, X., Archilla, A.S., Frisina, R.D., Borkholder, D.A. 2009. Intracochlear infusions: a surgical approach to reduce concentration gradient within the cochlea. *Assoc Res Otolaryngol*, Abstract 353, volume 32.
- Montenez, J. P., Delaisse, J. M., Tulkens, P. M., Kishore, B.K. 1994. Increased activities of cathepsin B and other lysosomal hydrolases in fibroblasts and bone tissue cultured in the presence of cystein proteinases inhibitors. *Life Sci.* 55, 1199-1208.
- Nicotera, T.M., Hu, B.H., Henderson, D. 2003. The caspase pathway in noise-induced apoptosis of chinchilla cochlea. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 4, 466-477.
- Niu, X., Chao, R., Canlon, B. 2003. Suppression of apoptosis occurs in the cochlea by sound conditioning. *Neuroreport.* 14, 1025-1029.
- Ohlemiller, K. K. 2008. Recent findings and emerging questions in cochlear noise injury. *Hear. Res.* 245, 5-17.
- Okuda, T., Sugahara, K., Takemoto, T., Shimogori, H., Yamashita, H. 2005. Inhibition of caspases alleviates gentamicin-induced cochlear damage in guinea pigs. *Auris Nasus Larynx.* 32, 33-37.
- Salvi, R.J., Shulman, A., Stracher, A., Ding, D., Wang, J. 1998. Protecting the inner ear from acoustic trauma. *Int. Tinnitus J.* 4, 11-15.

- Sendowski, I., Abaamrane, L., Raffin, F., Cros, A., Clarençon, D. 2006. Therapeutic efficacy of intra-cochlear administration of methylprednisolone after acoustic trauma caused by gunshot noise in guinea pigs. *Hear. Res.* 221, 119-127.
- Sorimachi, H. 2000. Structure and function of calpain and its homologues. *Seikagaku*, 72, 1297-1315.
- Suc, B., Poulet, M., Asperge, A., Vix, J., Barberot, J.P., Doucet, F. 1994. Clinical development of acute noise-induced acoustic trauma. An evaluation of a study of 250 cases. *Ann. Otolaryngol. Chir. Cervicofac.* 111, 319-324.
- Wang, J., Ding, D., Shulman, A., Stracher, A., Salvi, R.J. 1999. Leupeptin protects sensory hair cells from acoustic trauma. *Neuroreport.* 10, 811-816
- Wang, J., Dib, M., Lenoir, M, Vago, P., Eybalin, M., Hameg, A., Pujol, R., Puel, J. 2002. Riluzole rescues cochlear sensory cells from acoustic trauma in guinea pig. *Neuroscience* 111, 635-648.
- Xiang J., Chao, D.T., Korsmeyer, S. J. 1996. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 14559-14563.
- Yang, W. P., Henderson, D., Hu, B. H., Nicotera, T. M. 2004. Quantitative analysis of apoptotic and necrotic outer hair cells after exposure to different levels of continuous noise. *Hear. Res.* 196, 69-76.

Figure captions

Fig. 1. Cochleograms showing the number of apoptotic hair cells (TUNEL-positive stained cells) for IHC and each of the three rows of OHCs as a function of time following the gunshot noise exposure. Postexposure times were: 1h, 3h, 24h and 48h.

Fig. 2. Images of TUNEL staining of the organ of Corti obtained by confocal fluorescent microscopy: (a) Control (without exposure to noise): no TUNEL-positive staining was found. (b) and (c) shows the organ of Corti 3 hours after gunshot noise exposure in the same cochlear region; (b) PI stained a number of cells with nuclear condensation (arrows). (c) PI and FITC-labelled nuclei appear respectively red and green. TUNEL-positive nuclei (Apoptotic nuclei) showed a combination of both types of labeling and appeared yellow.

Fig. 3. Average (n=12) hearing losses for non-treated (shaded bars) and leupeptin-treated (black bars) guinea pigs at 2, 7 and 14 days after gunshot noise exposure.

Fig. 4. Average (n=18) hearing losses for non-treated (shaded bars) and z-VAD-FMK-treated (black bars) in guinea pigs at 2, 7 and 14 days after gunshot noise exposure. (** p<0.01)

Fig. 5. Average cochleograms (n=8) following gunshot noise exposure in non-treated (gray) and leupeptin-treated (black) ears. (*p<0.05; **p <0.01).

Fig. 6. Average cochleograms (n=8) following gunshot noise exposure in non-treated (gray) and z-VAD-FMK-treated (black) ears after 15 days of recovery. (*p<0.05; **p <0.01).

Fig.7. Cochleograms for two ears of the same animal following gunshot noise exposure. One ear (right) was non-treated, while the other ear (left) was treated with z-VAD-FMK.

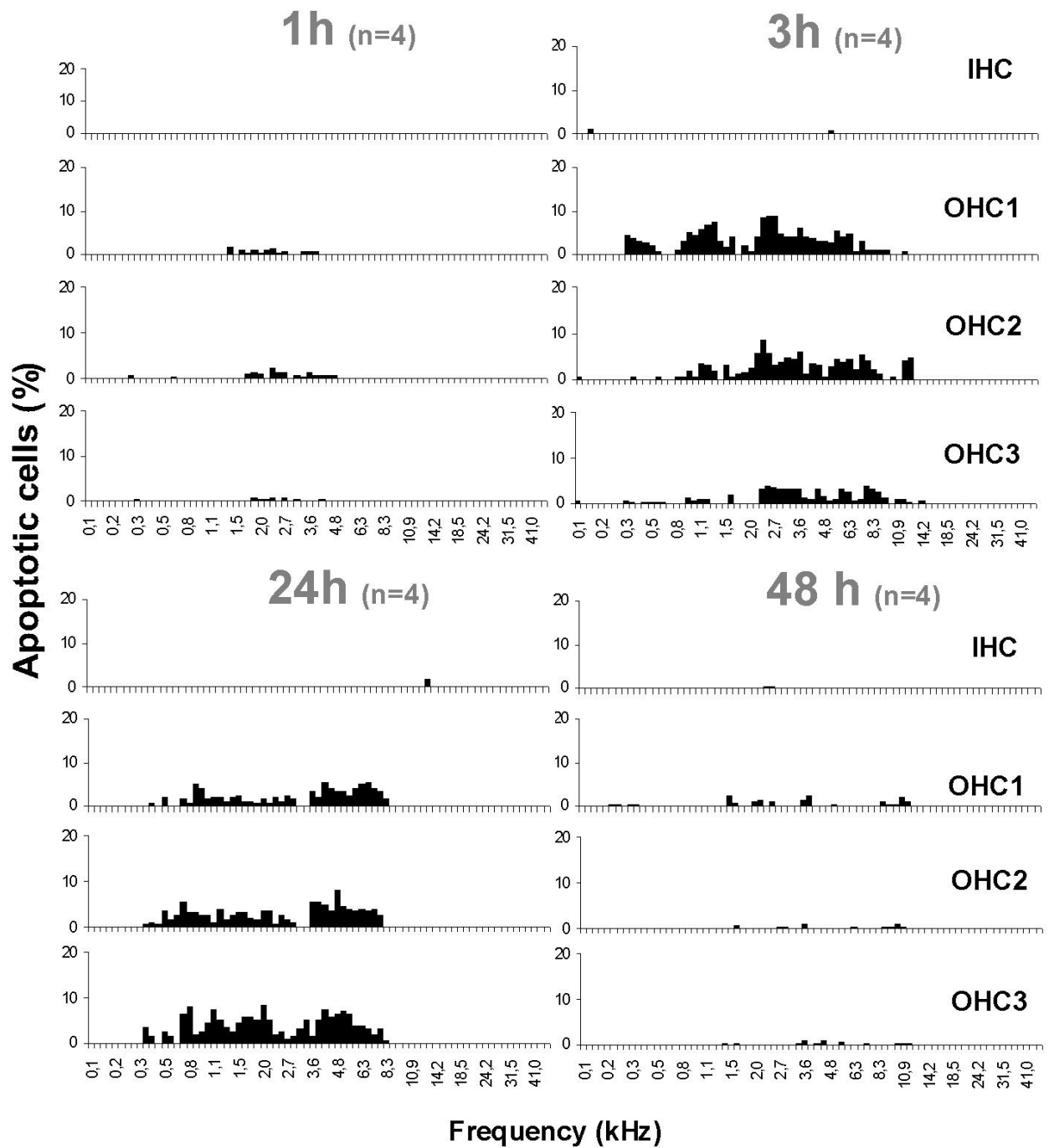


Fig. 1. Cochleograms showing the number of apoptotic hair cells (TUNEL-positive stained cells) for IHC and each of the three rows of OHCs as a function of time following the gunshot noise exposure. Postexposure times were 1h, 3h, 24h and 48h.

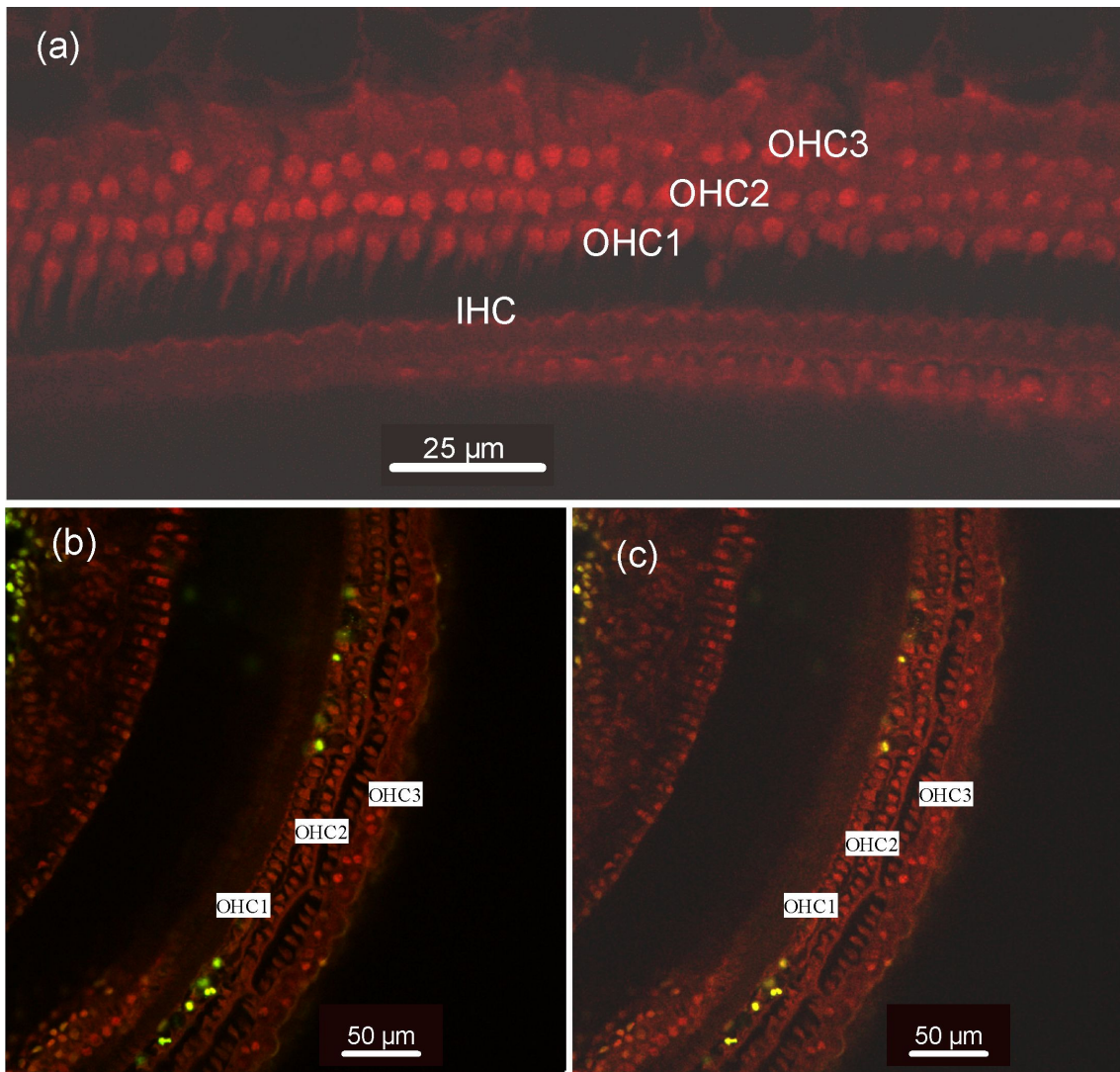


Fig. 2. Images of TUNEL staining of the organ of Corti obtained by confocal fluorescent microscopy: (a) Control (without exposure to noise): no TUNEL-positive staining was found. (b) and (c) shows the organ of Corti 3 hours after gunshot noise exposure in the same cochlear region; (b) PI stained a number of cells with nuclear condensation (arrows). (c) PI and FITC-labelled nuclei appear respectively red and green. TUNEL-positive nuclei (Apoptotic nuclei) showed a combination of both types of labeling and appeared yellow.

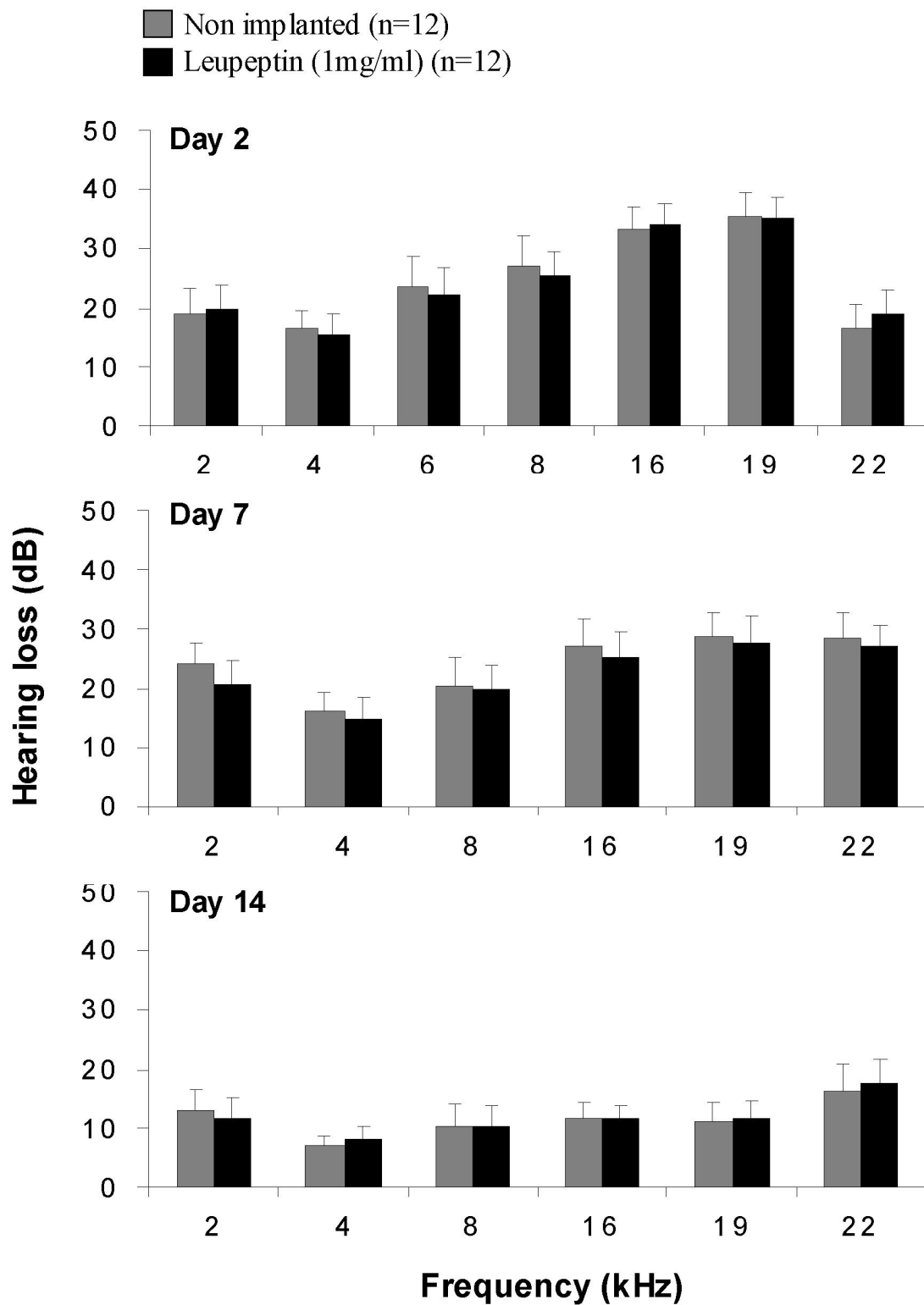


Fig. 3. Average (n=12) hearing losses for non-treated (shaded bars) and leupeptin-treated (black bars) guinea pigs at 2, 7 and 14 days after gunshot noise exposure.

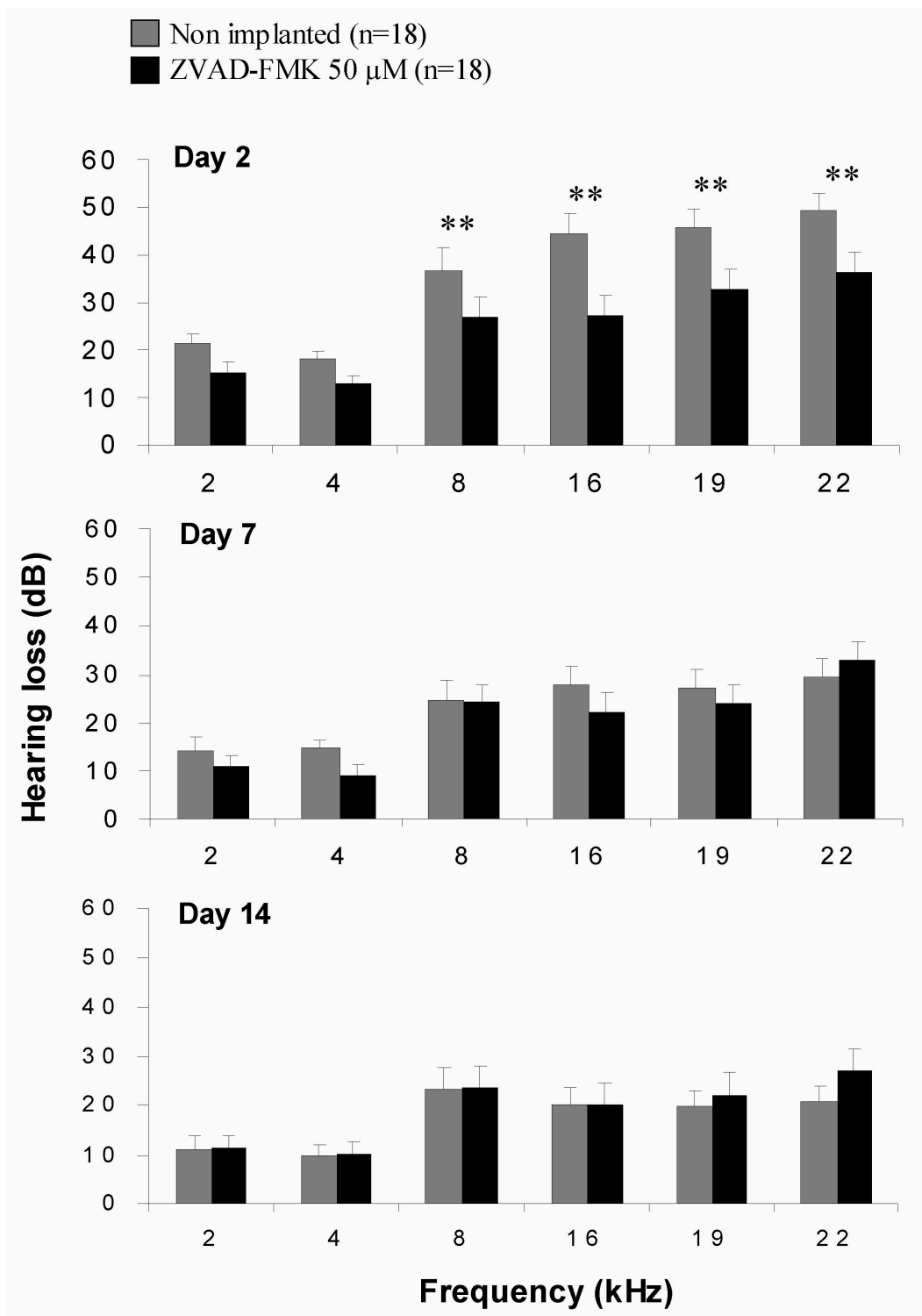


Fig. 4. Average (n=18) hearing losses for non-treated (shaded bars) and z-VAD-FMK-treated (black bars) in guinea pigs at 2, 7 and 14 days after gunshot noise exposure. (** p<0.01)

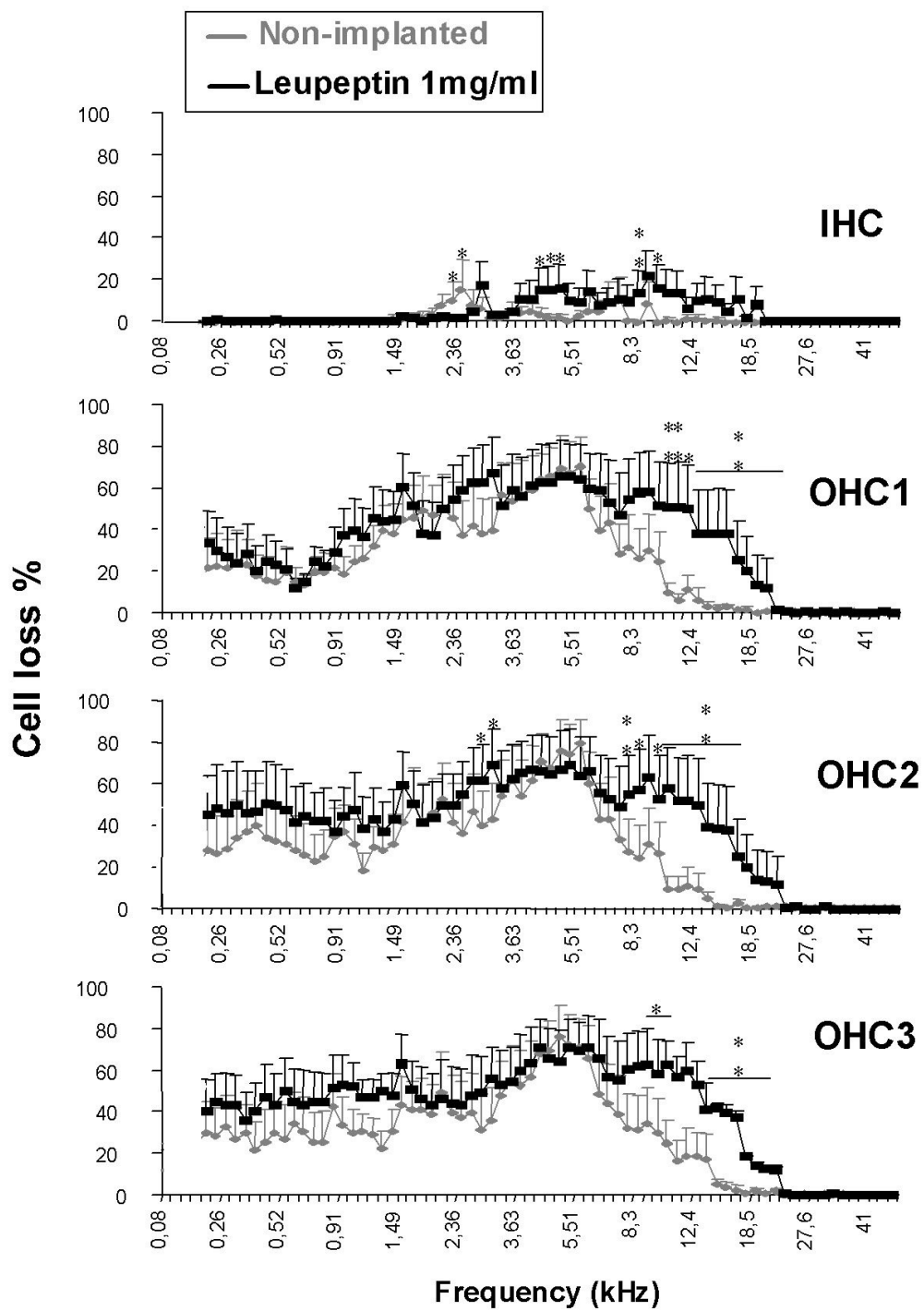


Fig. 5. Average cochleograms (n=8) following gunshot noise exposure in non-treated (gray) and leupeptin-treated (black) ears. (*p<0.05; **p < 0.01).

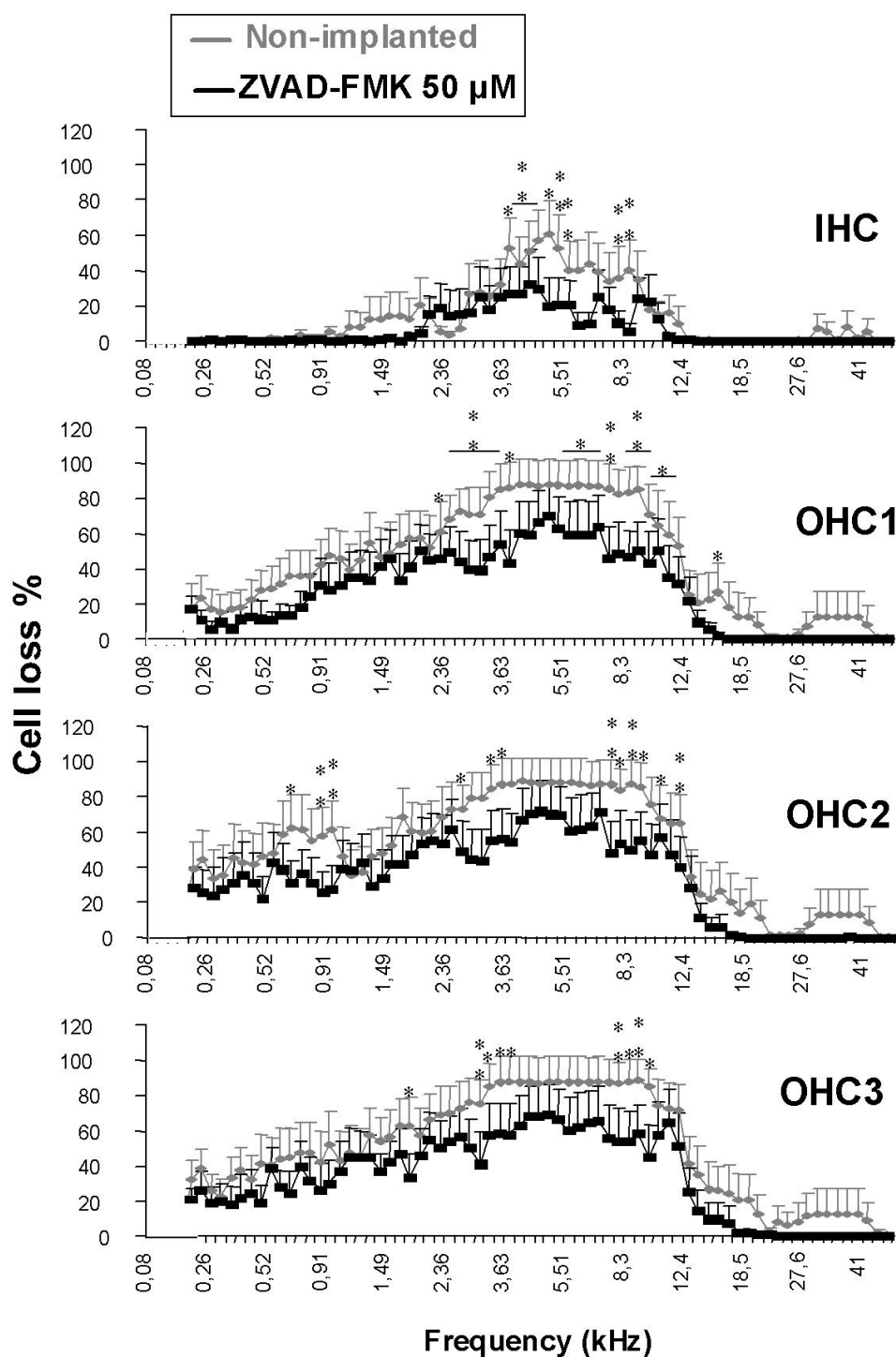


Fig. 6. Average cochleograms (n=8) following gunshot noise exposure in non-treated (gray) and z-VAD-FMK-treated (black) ears after 15 days of recovery. (*p<0.05; **p <0.01).

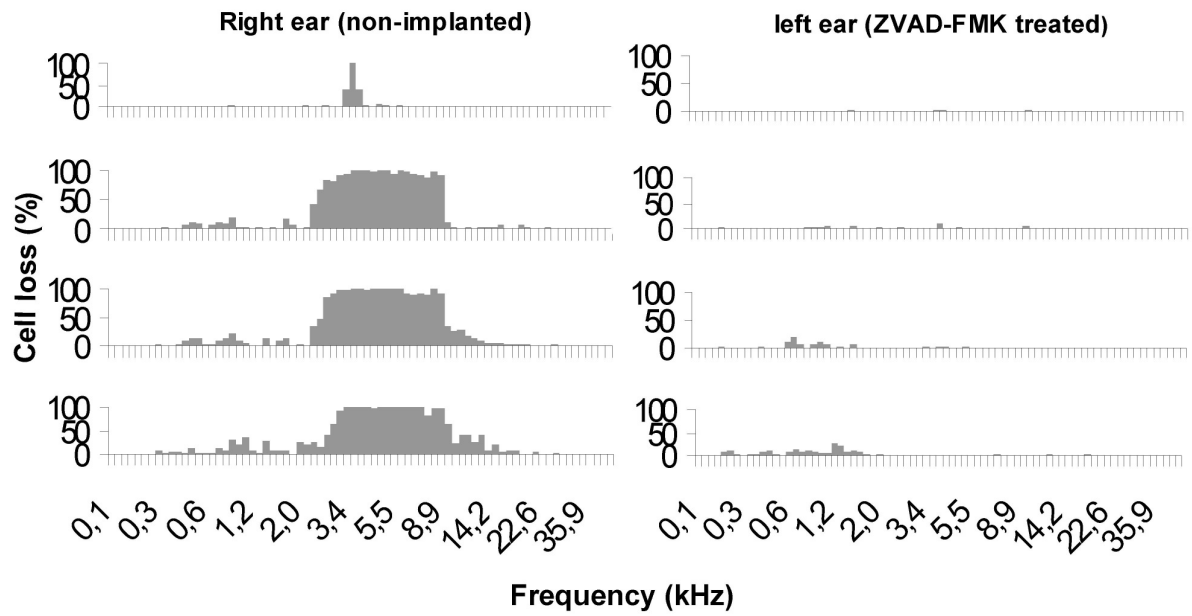


Fig.7. Cochleograms for two ears of the same animal following gunshot noise exposure. One ear (right) was non-treated, while the other ear (left) was treated with z-VAD-FMK.

Discussion générale

Les résultats obtenus dans nos différentes expérimentations nous permettent de discuter plusieurs points.

1. Modèle de traumatisme sonore par bruit d'arme

Le modèle de bruit impulsionnel utilisé dans nos expérimentations est particulièrement lésionnel puisque trois tirs suffisent à provoquer des pertes auditives permanentes chez le cobaye. Ce type de bruit présente un front de montée extrêmement court ($<5\mu\text{s}$) et un niveau de pic très élevé (6500 pa). En France, on dénombre environ 1000 nouveaux cas de traumatisme sonore chaque année parmi le personnel militaire (Suc et coll. 1994). Depuis quelques années, ce nombre est en nette progression (Verret et coll. 2005). La majorité de ces traumatismes (96%) surviennent au cours de l'utilisation d'une arme à feu (Labarère et coll., 2000). Chez l'Homme, ce type de traumatisme se caractérise le plus souvent par des pertes à 6 kHz et l'apparition d'acouphènes. Dans nos études, les pertes auditives observées chez le cobaye juste après l'exposition au bruit concernent toutes les fréquences et sont plus marquées dans la zone des 16-22 kHz. Cela est probablement lié au fait que, dans cette espèce, les seuils auditifs sont les meilleurs à ce niveau. Ceci est vrai pour l'aspect fonctionnel mais ce sont les cellules placées à 4-5 kHz qui sont les plus touchées (cochléogrammes). Que ce soit chez l'Homme ou chez l'animal, la susceptibilité individuelle à ce type de bruit est particulièrement variable selon les sujets. Pour limiter cet inconvénient, la méthodologie consiste à comparer les deux oreilles d'un même animal. Cette méthode, décrite précédemment par Himeno et coll. (2002), a été utilisée pour les traitements intra-cochléaires utilisant la méthylprednisolone et les anti-apoptotiques. Chez un même animal, une oreille est traitée et l'autre non.

2. Intérêt de la voie d'administration intra-cochléaire et applications possibles en clinique

La méthylprednisolone et les anti-apoptotiques ont été testés par voie intra-cochléaire. Outre l'action ciblée (nécessaire pour des anti-apoptotiques) des substances, cette voie présente plusieurs avantages. Cette voie d'administration a été testée dans différentes pathologies de l'oreille interne comme la maladie de Ménière ou les surdités brusques (Jackson et Silverstein, 2002 ; Doyle et coll., 2004 ; Light et Silverstein, 2004 ; Swann et coll., 2008 ; McCall et coll., 2009) pour des revues de la question. En pratique, trois méthodes d'administration locale chez l'homme ont déjà été employées : l'injection trans-tympanique, l'utilisation de micro-catheters (Round Window m-Cath, Durect Corp., Cupertino, California) et les « micro-éponges » de Silverstein (Micro-medics, Eagan, Minnesota) (Silverstein, 1999 ; Seidman et Vivek, 2004). Les résultats obtenus sont très prometteurs. En effet, l'administration locale limite les effets secondaires (ulcères gastriques, inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire, cataracte et hyperglycémie entre autre) (Czock et coll., 2005). De plus, elle permet le traitement de patients chez qui les corticoïdes par voie générale sont contre-indiqués. Cette voie d'administration n'est cependant pas sans risque puisque quelques cas de surdité (cophose) et acouphènes ont été rapportés (Shirwany et coll., 1998 ; Kopke et coll., 2001 ; Doyle et coll., 2004).

3. Dilemme : fonctionnalité et survie des cellules auditives

Dans les cas des traitements intra-cochléaires utilisant la méthylprednisolone ou l'anti-apoptotique z-VAD-FMK, nous avons relevé une accélération de la récupération auditive. Cependant, au-delà de 14 jours d'évolution les pertes auditives sont comparables pour les

oreilles traitées et non traitées. Au regard de ces résultats, nous pourrions évoquer une diffusion des substances thérapeutiques de l'oreille implantée vers l'oreille non implantée. En effet, il existe une communication possible entre les deux oreilles via l'aqueduc cochléaire et le liquide céphalo-rachidien : c'est l'effet « Schreiner ». Chez le cobaye, des substances peuvent ainsi diffuser d'une cochlée à l'autre (Schreiner, 1964). Cependant, cette diffusion dépend de la taille des molécules. La diffusion de la méthylprednisolone et du z-VAD-FMK semble négligeable compte-tenu de leur taille. Il s'agit d'une récupération spontanée que nous avons déjà observée dans d'autres études en l'absence de tout traitement (Sendowski et coll., 2006). Ces traitements pourraient donc accélérer la récupération fonctionnelle sans en modifier le niveau des seuils à long terme. Ce résultat pourrait remettre en cause l'intérêt de ce type de thérapeutique. Cependant, l'analyse des cochléogrammes permet d'apporter de nouveaux arguments en faveur de la mise en place d'un traitement. En effet, il apparaît clairement que la méthylprednisolone et le z-VAD-FMK permettent la survie des cellules ciliées mais ne permettent pas le maintien de leur fonctionnalité. Des expérimentations supplémentaires pourraient tester l'efficacité de ces substances associées à un autre traitement.

4. Une administration à plus long terme : un meilleur résultat

Ces traitements (méthylprednisolone et z-VAD-FMK) nécessitent une intervention rapide et les effets sont visibles à court terme. Dans notre étude sur trois mois d'évolution, c'est avec un traitement magnésium durant un mois que l'on obtient la meilleure fonctionnalité auditive et que les pertes cellulaires sont limitées (Abaamrane et coll., 2009). Sachant que l'apoptose n'existe pas au-delà de 7 jours, le magnésium doit vraisemblablement agir par un autre mécanisme que la limitation de l'apoptose. Le magnésium pourrait agir sur la nécrose

observée plus tardivement par d'autres auteurs (Yang et coll., 2004). De plus, l'administration à long terme est intéressante dans la mesure où elle laisse une marge de temps d'action. En effet, la prise en charge d'un traumatisme sonore est rarement précoce dans la réalité des faits. L'administration d'un traitement anti-apoptotique précoce complémentaire pourrait moduler les voies métaboliques impliquées dans la mort cellulaire.

5. Bruit d'arme / Bruit continu

Notre étude comparative menée sur les deux types de traumatismes sonores (bruit d'arme/ bruit continu) confirme l'existence de mécanismes lésionnels différents. Hamernik et coll. (1993) suggèrent que le bruit impulsionnel est plus lésionnel que le bruit continu chez l'animal. Les études chez l'humain ont montré un résultat similaire (Irle et coll., 1998). Les données du monde industriel et militaire confirment que le bruit impulsionnel est plus lésionnel que le bruit continu à niveau d'énergie équivalent (Pekkarinen, 1995 ; Hu et coll., 2006 ; Wang et coll., 1998 ; Hamernik et coll., 1972 ; Hamernik et coll., 1998 ; Mäntysalo et coll., 1984). Dans notre étude, les mesures auditives par la technique de l'électrocochléographie montrent que les animaux exposés à un bruit d'arme présentent moins de fatigue auditive à EPS équivalentes. Curieusement, les cochlées exposées au bruit d'arme présentent plus de pertes cellulaires. Plusieurs auteurs ont mesuré des seuils auditifs normaux en présence de pertes cellulaires (Hunter-Duvar et Elliott, 1972 ; Henderson et coll., 1974 ; Ward et Duval, 1971). Inversement, les cellules peuvent être présentes mais non fonctionnelles (Chen et Fechter, 2003). Ce fait peut s'expliquer par la morphologie des cellules endommagées. En effet, nos observations par microscopie électronique à balayage montrent que les cellules présentent des détachements ou des ruptures ciliaires. Le bruit continu a donc endommagé les cils des cellules détruisant ainsi leur fonctionnalité auditive

mais leur présence reste néanmoins détectée dans les cochléogrammes. Ce phénomène avait été décrit par Slepecky et coll. (1982) qui avaient montré qu'il existe une relation entre la présence de pertes auditives permanentes et la morphologie des stéréocils.

6. Un résultat fondamental : la voie de mort cellulaire activée après traumatisme sonore par bruit d'arme

Dans notre expérimentation, nous avons testé deux anti-apoptotiques (leupeptine et z-VAD-FMK) afin de répondre à deux questions liées : la substance est-elle efficace après exposition à un bruit d'arme ? Par conséquent, quelle voie de l'apoptose entre en jeu ? L'expérimentation a ainsi deux buts : clinique et fondamental.

Le résultat le plus important de cette étude est que l'inhibiteur de caspases (z-VAD-FMK) permet une accélération de la récupération auditive et réduit la perte des cellules ciliées après l'exposition à un bruit d'arme alors que l'inhibiteur des calpaines (leupeptine) n'a aucun effet thérapeutique positif sur l'audition et sur la survie des cellules ciliées. Dans une précédente étude, nous avons montré que l'apoptose apparaît dans les premières heures après le traumatisme sonore par bruit d'arme. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par Hu et coll. (2005) dans le cas d'un traumatisme sonore par un bruit impulsionnel répétitif. C'est la raison pour laquelle la substance anti-apoptique a été administrée par la voie intra-cochléaire dans la première heure après l'exposition sonore (durée de l'intervention chirurgicale pour l'implantation de la pompe). Dans cette étude, la leupeptine, à la concentration de 1mg/ml n'a pas eu d'effet protecteur sur les pertes cellulaires. Cependant, Wang et coll. (1999) avaient observé que la leupeptine (1mg/ml) protégeait les cellules auditives d'un traumatisme acoustique par bruit continu (100 ou 105 dB, 4 kHz, pendant 48 h). Ces résultats suggèrent que les voies apoptotiques pourraient en partie différer selon le type de traumatisme. Il semble

donc que lors d'un traumatisme sonore par bruit d'arme, la voie de mort cellulaire empruntée serait préférentiellement la voie des caspases alors que lors d'un traumatisme sonore par bruit continu, la voie des calpaïnes serait activée. Ce résultat est fondamental dans la mesure où il permet de comprendre les voies physiologiques activées et ainsi d'utiliser l'agent thérapeutique adapté. Cependant, les mécanismes par lesquels les pertes cellulaires ont été plus importantes pour les oreilles traitées à la leupeptine restent encore inconnus. Wang et coll. (1999) utilisaient le chinchilla en modèle animal, nous pouvons supposer qu'il existe des différences de susceptibilité au traitement selon le modèle animal.

Le z-VAD-FMK a été utilisé pour limiter l'apoptose induite par le traumatisme sonore par bruit d'arme. Deux jours après le tir, les oreilles traitées présentent significativement de meilleurs seuils auditifs pour les hautes fréquences. Après 7 et 14 jours de récupération, les seuils auditifs sont équivalents. Ceci suggère que l'inhibiteur de caspases a uniquement un rôle d'accélération de la récupération auditive. Ce même phénomène avait déjà été observé avec l'utilisation d'autres traitements tels que la méthylprednisolone (Sendowski et coll., 2006 ; Abaamrane et coll., 2009). Les cochléogrammes ont permis d'observer que le traitement permet la survie des cellules ciliées. Cependant, en moyenne, cette préservation reste modérée, alors que ce traitement a été particulièrement efficace chez quelques animaux. La diffusion intra-cochléaire, qui, vraisemblablement, diffère d'un animal à l'autre mériterait donc d'être améliorée.

Conclusions et perspectives

CONCLUSION GENERALE

Malgré une prévention renforcée (port de protections auditives), les traumatismes sonores aigus par bruit d'arme demeurent un enjeu essentiel pour les armées, par leur fréquence qui reste élevée, mais aussi par leurs conséquences fonctionnelles individuelles et les incidences en matière d'indemnisation qui sont lourdes. Il n'existe pas aujourd'hui un principe actif unique permettant une protection et une réparation optimale des cellules lésées après un traumatisme sonore. Les traitements sont d'une efficacité variable. En effet, les traitements par voie intra-cochléaire à base de corticoïdes (méthylprednisolone) ou d'inhibiteurs de caspases (z-VAD-FMK) permettent surtout une accélération de la récupération fonctionnelle auditive associée à une survie des cellules ciliées mais le bénéfice est modéré à long terme. L'administration à long terme (un mois) de magnésium a permis de limiter efficacement les pertes cellulaires ainsi que les pertes auditives. Il semble que la prise en charge thérapeutique du traumatisme sonore doit être plurielle. L'association de différents traitements (par exemple magnésium et corticoïdes) mériterait d'être évaluée chez l'animal puis chez l'Homme. Le magnésium est un agent thérapeutique très intéressant dans la mesure où il ne présente que peu d'effets secondaires et de contre-indications chez l'Homme. Il peut donc dès à présent faire l'objet d'une étude clinique chez des militaires après traumatisme sonore.

Outre l'aspect clinique de la thérapeutique du traumatisme sonore, cette thèse de recherche a répondu également à des questions de nature fondamentale sur la physiopathologie. En effet, la cinétique de l'apoptose menée sur deux types de traumatisme différents (bruit continu/bruit d'arme) a permis d'évaluer le délai d'apparition de cette voie de mort cellulaire. L'importance de l'apoptose varie en fonction des conditions traumatisantes. L'efficacité de deux substances anti-apoptotiques (leupeptine et z-VAD-FMK) a conforté cette observation. La leupeptine n'a pas eu d'effet thérapeutique sur le modèle de traumatisme sonore par bruit d'arme contrairement au z-VAD-FMK. Lors d'un traumatisme sonore par bruit d'arme, la voie des

caspases est donc préférentiellement activée. La voie des calpaines serait donc secondaire dans ce type de traumatisme. Il est intéressant de connaître les voies impliquées dans la mort cellulaire des cellules auditives afin de mieux cibler les agents thérapeutiques à l'avenir.

PERSPECTIVES

L'extrapolation de ces résultats à l'Homme reste aujourd'hui un challenge. L'obstacle majeur à la mise en œuvre d'essais cliniques chez l'Homme réside dans les effets secondaires des substances testées chez l'animal si elles étaient délivrées par voie générale. La pharmacologie locale devrait permettre de s'affranchir de ces effets indésirables. Cependant, la majorité des résultats présentés dans ce mémoire sont basés sur des expériences où les substances sont appliquées directement dans la cochlée via un orifice. Il est difficile d'envisager une approche aussi invasive chez l'Homme. Les substances thérapeutiques pourraient être délivrées localement via la fenêtre ronde à condition de tester leur capacité à traverser la membrane de celle-ci, ainsi que leur concentration et durée d'application efficace.

Ces résultats préliminaires représentent cependant un espoir pour la thérapeutique du traumatisme sonore dans les armées d'une part et dans le monde industriel d'autre part.

Une autre perspective d'étude intéressante consiste en l'association de plusieurs traitements ayant des cibles d'action différentes. L'association des corticoïdes à une oxygénation hyperbare a permis une meilleure récupération auditive chez le cobaye (D'Aldin et coll., 1999). Plus récemment, les mêmes résultats ont été obtenus pour des traumatismes sonores causant plus de pertes auditives chez ce même modèle animal (40 dB versus 20-25 dB) (115 dB à 8000 Hz pendant 45 minutes) (Fakhry et coll., 2007). D'autres auteurs ont testé des associations d'agents anti-oxydants avec d'autres types d'agents thérapeutiques. Récemment, il a été démontré que les agents anti-oxydants vitamine A, C et E, en synergie avec le

magnésium réduisent les pertes auditives et la mort des cellules auditives après un traumatisme sonore chez le cobaye (Le Prell et coll., 2007). L'association de corticoïdes à d'autres substances (facteurs de croissance, magnésium) serait particulièrement intéressante à étudier en ayant comme objectif de permettre la fonctionnalité des cellules que l'on réussit à maintenir en vie. Dans tous les cas, si la voie d'administration locale semble une voie d'avenir, il est important de s'assurer du ratio bénéfice/risque encouru avant d'entreprendre un tel traitement. Dans ce cadre, l'expérimentation animale préalable reste incontournable.

Actuellement, une des voies d'avenir pour le traitement des traumatismes sonores repose sur l'utilisation de cellules souches. Il s'agit de transplanter des cellules souches dans l'oreille interne afin de remplacer les cellules ciliées déficientes et/ou manquantes. Cette approche prometteuse est très récente et reste encore au stade de l'expérimentation animale.

Enfin, tester l'effet potentiellement protecteur d'un enrichissement sonore post-traumatique après traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye pourrait être une autre nouvelle approche thérapeutique. En effet, plusieurs études ont montré l'intérêt d'une exposition sonore préventive chez l'animal et chez l'Homme (Miller et coll., 1963 ; Henselman et coll., 1994 ; Miyakita et coll., 1992). D'autres travaux plus rares démontrent l'intérêt de l'application post-traumatique de cette méthode (Fukushima et coll., 1990 ; Niu et coll., 2004 ; Norena et coll., 2005, 2006 ; Tanaka et coll., 2009). Des études préliminaires sont nécessaires afin de déterminer les paramètres précis de cet environnement sonore à appliquer.

La connaissance plus précise de la physiopathologie auditive permet de mettre en place des stratégies thérapeutiques très prometteuses chez l'animal puis chez l'Homme. Des travaux de recherche supplémentaires sont primordiaux afin de réaliser de futurs essais cliniques.

Références bibliographiques

Abaamrane L., Raffin F., Gal M., Avan P., Sendowski I. (2009) Long-term administration of magnesium after acoustic trauma caused by gunshot noise in guinea pigs. *Hearing Res.* 247: 137-145.

Ades H.W., Trahiotis C., Kokko-Cunningham A., Averbuch A. (1971) Comparison of hearing thresholds and morphological changes in the chinchilla after exposure to 4 kHz tones. *Acta Otolaryngol.* 78: 192-206.

Ahn J.H., Kang H.H., Kim Y.J., Chung J.W. (2005) Anti-apoptotic role of retinoic acid in the inner ear of noise-exposed mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 335: 485-490.

Altura B.M., Altura B.T., Gebrewold A., Ising H., Günther T. (1992) Noise-induced hypertension and magnesium in rats: relationship to microcirculation and calcium. *J Appl Physiol.* 72: 194-202.

Aoki D., Takegoshi H., Kikuchi S. (2006) Evaluation of super-high-dose steroid therapy for sudden sensorineural hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 134 : 783-787.

Attias J., Weisz G., Almog S., Shahar A., Wiener M., Joachims Z., Netzer A., Ising H., Rebentisch E., Guenther T. (1994) Oral magnesium intake reduces permanent hearing loss induced by noise exposure. *Am J Otolaryngol.* 15 : 26-32.

Au P.Y., Martin N., Chau H., Moemeni B., Chia M., Liu F.F., Minden M., Yeh W.C. (2005) The oncogene PDGF-B provides a key switch from cell death to survival induced by TNF. *Oncogene.* 24: 3196-3205.

Avan P., Bonfils P., Mom T. (2001) Correlations among distortion product otoacoustic emissions, thresholds and sensory cell impairment. In: Henderson, D., Prasaher D., Kopte R., Salvi R., Hamernik R.P. (Eds), *Noise Induced Hearing Loss: Basic mechanisms, preventive and control.* Noise Research Networks publications, London, pp. 411-427.

- Bachmann G., Su J., Zumege C., Wittekindt C., Michel O. (2001) Permeability of the round window membrane for prednisolone-21-hydrogen succinate. Prednisolone content of the perilymph after local administration vs. systemic injection. *HNO*. 49: 538-542.
- Bartus R.T., Elliott P.J., Hayward N.J., Dean R.L., Harbeson S., Straub J.A., Li Z., Powers J.C. (1995) Calpain as a novel target for treating acute neurodegenerative disorders. *Neurol Res*. 17: 249-258.
- Batandier C., Fontaine E., Kériel C., Leverve X.M. (2002) Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects. *J Cell Mol Med*. 6: 175-187.
- Beato M., Herrlich P., Schütz G. (1995) Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*. 83: 851-857.
- Bellance N., Lestienne P., Rossignol R. (2009) Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Front Biosci*. 14:4015-4034.
- Bermingham N.A., Hassan B.A., Price S.D., Vollrath M.A., Ben-Arie N., Eatock R.A., Bellen H.J., Lysakowski A., Zoghbi H.Y. (1999) *Math1*: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science*. 284: 1837-1841.
- Biswas R.S., Cha H.J., Hardwick J.M., Srivastava R.K. (2001) Inhibition of drug-induced Fas ligand transcription and apoptosis by Bcl-XL. *Mol Cell Biochem*. 225: 7-20.
- Bohne B.A, Harding G.W., Lee S.C. (2007) Death pathways in noise-damaged outer hair cells. *Hear. Res*. 223: 61-70.
- Boldin M.P., Goncharov T.M., Goltsev Y.V., Wallach D. (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 85: 803-815.

Branis M., Burda H. (1988) Effect of ascorbic acid on the numerical hair cell loss in noise exposed guinea pigs. *Hear Res.* 33: 137-140.

Breckenridge D.G., Germain M., Mathai J.P., Nguyen M., Shore, G.C. (2003) Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene.* 22: 8608-8618.

Brenner C., Marzo I., Kroemer G. (1998) A revolution in apoptosis: from a nucleocentric to a mitochondriocentric perspective. *Exp Gerontol.* 33: 543-553.

Brownell W.E., Bader C.R., Bertrand D., De Ribaupierre Y. (1985) Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science.* 227: 195-196.

Cabezudo L.M. (1978) The ultrastructure of the basilar membrane in the cat. *Acta Otolaryngol.* 86: 160-175.

Cassandro E., Sequino L., Mondola P., Attanasio G., Barbara M., Filipo R. (2003) Effect of superoxide dismutase and allopurinol on impulse noise-exposed guinea pigs--electrophysiological and biochemical study. *Acta Otolaryngol.* 123: 802-807.

Chan S.L., Mattson M.P. (1999) Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res.* 58: 167-190.

Chandrasekhar S.S. (2001) Intratympanic dexamethasone for sudden sensorineural hearing loss: clinical and laboratory evaluation. *Otol Neurotol.* 22: 18-23.

Chandrasekhar S.S., Rubinstein R.Y., Kwartler J.A., Gatz M., Connelly P.E., Huang E., Baredes S. (2000) Dexamethasone pharmacokinetics in the inner ear: comparison of route of administration and use of facilitating agents. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 122 : 521-528

Chautan M., Chazal G., Cecconi F., Gruss P., Golstein P. (1999) Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol.* 9: 967-970.

Chen G.D., Fechter L.D. (2003) The relationship between noise-induced hearing loss and hair cell loss in rats. *Hear Res.* 177: 81-90.

Cheng A.G., Huang T., Stracher A., Kim A., Liu W., Malgrange B., Lefebvre P.P., Schulman A., Van de Water T.R. (1999) Calpain inhibitors protect auditory sensory cells from hypoxia and neurotrophin-withdrawal induced apoptosis. *Brain Res.* 850: 234-243.

Chinnaiyan A.M., O'Rourke K., Tewari M., Dixit V.M. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* 81: 505-512.

Chinnaiyan A.M., Tepper C.G., Seldin M.F., O'Rourke K., Kischkel F.C., Hellbardt S., Krammer P.H., Peter M.E., Dixit V.M. (1996) FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 271: 4961-4965.

Clarke P.G. (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol.* 181: 195-213.

Cohen J.J. (1993) Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp Pract.* 28: 35-43.

Coleman JK, Littlesunday C, Jackson R, Meyer T. (2007) AM-111 protects against permanent hearing loss from impulse noise trauma. *Hear Res.* 226: 70-78.

Corbacella E., Lanzoni I., Ding D., Previati M., Salvi R. (2004) Minocycline attenuates gentamicin induced hair cell loss in neonatal cochlear cultures. *Hear Res.* 197: 11-18.

Cudennec Y.F., Charles M.S., Profetta D. (1983) Le traumatisme sonore aigu : notre expérience thérapeutique. *Acta Med Belg.* 135 : 155-160.

Cudennec Y.F., Lory D., Poncet J.L., Buffe P. (1994) Traumatismes sonores aigus. *EMC Oto-rhino-laryngol.* 20-185-A-10.

Czock D., Keller F., Rasche F.M., Häussler U. (2005) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet.* 44 :61-98.

D'Aldin C., Cherny L., Devrière F., Dancer A. (1999) Treatment of acoustic trauma. *Ann N Y Acad Sci.* 884 : 328-344.

Dancer A. (1991) Le traumatisme acoustique. *Médecine/Sciences.* 7: 357-367.

De Bosscher K., Vanden Berghe W., Vermeulen L., Plaisance S., Boone E., Haegeman G. (2000) Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 3919-3924.

Devrière F., Ising H., Dancer A. (1991) Déficits auditifs provoqués par l'exposition à des bruits impulsionnels chez des cobayes carencés ou enrichis en magnésium. *J. Acoustique.* 4 : 363-366.

Dong Z., Saikumar P., Weinberg J.M., Venkatachalam M.A. (1997) Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol.* 151: 1205-1213.

Doyle K.J., Bauch C., Battista R., Beatty C., Hughes G.B., Mason J., Maw J., Musiek F.L. (2004) Intratympanic steroid treatment: a review. *Otol Neurotol.* 25: 1034-1039.

Duan M., Chen Z., Qiu J., Ulfendahl M., Laurell G., Borg E., Ruan R. (2006) Low-dose, long-term caroverine administration attenuates impulse noise-induced hearing loss in the rat. *Acta Otolaryngol.* 126: 1140-1147.

Duan M., Qiu J., Laurell G., Olofsson A., Counter S.A., Borg E. (2004) Dose and time-dependent protection of the antioxidant N-L-acetylcysteine against impulse noise trauma. *Hear Res.* 192:1-9.

Dubray C., Alloui A., Bardin L., Rock E., Mazur A., Rayssiguier Y., Eschali r A., Lavarenne J. (1997) Magnesium deficiency induces an hyperalgesia reversed by the NMDA receptor antagonist MK801. *Neuroreport*. 8: 1383-1386.

Earnshaw W.C. (1995) Apoptosis: lessons from in vitro systems. *Trends Cell Biol*. 5(6): 217-220.

Ebel H., Günther T. (1980) Magnesium metabolism: a review. *J Clin Chem Clin Biochem*. 18 : 257-270.

Eldadah B.A., Faden A.I. (2000) Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J Neurotrauma*. 17: 811-829.

El-Hennawi D.M., El-Deen M.H., Abou-Halawa A.S., Nadeem H.S., Ahmed M.R. (2005) Efficacy of intratympanic methylprednisolone acetate in treatment of drill-induced sensorineural hearing loss in guinea pigs. *J Laryngol Otol*. 119: 2-7.

El Idrissi A, Trenkner E. (1999) Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism. *J Neurosci*. 19 : 9459-9468.

Emmerich E., Richter F., Meissner W., Dieroff H.G. (2000) The effect of impulse noise exposure on distortion product otoacoustic emissions in the awake guinea pig. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 257: 128-132.

Enari M., Hug H., Nagata S. (1995) Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature*. 375: 78-81.

Erin N., Bronson S.K., Billingsley M.L. (2003a) Calcium-dependent interaction of calcineurin with Bcl-2 in neuronal tissue. *Neuroscience*. 117: 541-555.

Erin N., Lehman R.A., Boyer P.J., Billingsley M.L. (2003b) In vitro hypoxia and excitotoxicity in human brain induce calcineurin-Bcl-2 interactions. *Neuroscience*. 117: 557-565.

Eshraghi A.A., Van de Water T.R. (2006) Cochlear implantation trauma and noise-induced hearing loss: Apoptosis and therapeutic strategies. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 288: 473-481.

Eybalin M. (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev.* 73: 309-373.

Fakhry N., Rostain J.C., Cazals Y. (2007) Hyperbaric oxygenation with corticoid in experimental acoustic trauma. *Hear Res.* 230: 88-92.

Fernandes-Alnemri T., Armstrong R.C., Krebs J., Srinivasula S.M., Wang L., Bullrich F., Fritz L.C., Trapani J.A., Tomaselli K.J., Litwack G., Alnemri E.S.(1996) In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 7464-7469.

Fesus L., Thomazy V., Falus A. (1987) Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett.* 224: 104-108.

Fetoni A.R., Piacentini R., Fiorita A., Paludetti G., Troiani D. (2009) Water-soluble Coenzyme Q10 formulation (Q-ter) promotes outer hair cells survival in a guinea pig model of noise induced hearing loss (NIHL). *Brain Res.* 1257: 108-116.

Fiers W., Beyaert R., Declercq W., Vandenabeele P. (1999) More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene.* 18: 7719-7730.

Fontaine E. (2001) Production and elimination of oxygen free radicals. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu.* 57-63.

Fortnum H.M., Marshall D.H., Summerfield A.Q. (2002) Epidemiology of the UK population of hearing-impaired children, including characteristics of those with and without cochlear implants--audiology, aetiology, comorbidity and affluence. *Int J Audiol.* 41:170-179.

Fridberger A., Flock A., Ulfendahl M., Flock B. (1996) Acoustic overstimulation increases outer hair cell Ca²⁺ concentrations and causes dynamic contractions of the hearing organ. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 7127-7132.

Fridberger A., Ulfendahl M. (1996) Acute mechanical overstimulation of isolated outer hair cells causes changes in intracellular calcium levels without shape changes. *Acta Otolaryngol*. 116: 17-24.

Fridberger A., Van Maarseveen J.T., Ulfendahl M. (1998) A, in vitro model for acoustic overstimulation. *Acta Otolaryngol*. 118: 352-361.

Fuchs P.A. (1996) Synaptic transmission at vertebrate hair cells. *Curr Opin Neurobiol*. 6: 514-519.

Fukushima N., White P., Harrison R.V. (1990) Influence of acoustic deprivation on recovery of hairs cells after acoustic trauma. *Hear. Res*. 50: 107-118.

Galifret Y. (1978). The mechanisms of sensory transduction. *J Physiol*. 74:121-129.

Galland L. 1991. Magnesium, stress and neuropsychiatric disorders. *Magnes Trace Elem*. 10: 287-301.

Gao G., Sun J.J., Gong S.S., Liu Y., Jiang P. (2009) Edavarone protects hearing from acute acoustic trauma in guinea pigs. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 44: 150-153.

Greenwood D.D. (1990) A cochlear frequency-position function for several species--29 years later. *J Acoust Soc Am*. 87 : 2592-2605.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1998) Free radicals in biology and medicine. Third ed. Oxford University Press, London.

Hamernik R.P., Ahroon W.A., Hsueh K.D., Lei S.F., Davis R.I. (1993) Audiometric and histological differences between the effects of continuous and impulsive noise exposures. *J Acoust Soc Am*. 93: 2088-2095.

Hamernik R.P., Ahroon W.A., Patterson J. (1988) Threshold recovery functions following impulse noise trauma. *J Acoust Soc Am.* 84: 941-950.

Hamernik R.P., Henderson D., Crossley J.J., Salvi R.J. (1974) Interaction of continuous and impulse noise: audiometric and histological effects. *J Acoust Soc Am.* 55: 117-121.

Hamernik R.P., Turrentine G., Roberto M., Salvi R., Henderson D. (1984) Anatomical correlates of impulse noise-induced mechanical damage in the cochlea. *Res.* 13: 229-247.

Hansson A.C., Cintra A., Belluardo N., Sommer W., Bhatnagar M., Bader M., Ganten D., Fuxe K. (2000) Gluco- and mineralocorticoid receptor-mediated regulation of neurotrophic factor gene expression in the dorsal hippocampus and the neocortex of the rat. *Eur J Neurosci.* 12: 2918-2934.

Haupt H., Scheibe F. (2002) Preventive magnesium supplement protects the inner ear against noise-induced impairment of blood flow and oxygenation in the guinea pig. *Magnes Res.* 15: 17-25.

Haupt H., Scheibe F., Mazurek B. (2003) Therapeutic efficacy of magnesium in acoustic trauma in the guinea pig. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 65: 134-139.

Hawkins J.E., Johnsson L.G., Preston R.E. (1972) Cochlear microvasculature in normal and damaged ears. *Laryngoscope.* 82: 1091-1104.

He L.M., Zhang C.G., Zhou Z., Xu T. (2003) Rapid inhibitory effects of corticosterone on calcium influx in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience.* 116: 325-333.

Heatwole V.M. (1999) TUNEL assay for apoptotic cells. *Methods Mol Biol.* 115: 141-148.

Heinrich U.R., Maurer J., Mann W. (1999) Ultrastructural evidence for protection of the outer hair cells of the inner ear during intense noise exposure by application of the organic calcium channel blocker diltiazem. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 61: 321-327.

Helfer T., Jordan N., Lee R. (2005) Postdeployment hearing loss in U.S. army soldiers seen at audiology clinics from april 1, 2003, through march 31, 2004. *Am J Audiol.* 14: 161-168.

Henderson D., Bielefeld E.C., Harris K.C., Hu B.H. (2006) The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear.* 27:1-19.

Henderson D., Hamernik R.P., Sitrler R. (1974) Audiometric and histological correlates of exposure to 1-msec noise impulses in the chinchilla. *J Acoust Soc Am.* 56: 1210-1221.

Henry K.R. (1992) Noise-induced auditory loss: influence of genotype, naloxone and methyl-prednisolone. *Acta Otolaryngol.* 112: 599-603.

Henselman L.W., Henderson D., Subramaniam M., Sallustio V. (1994) The effect of conditioning exposures on hearing loss from impulse noise. *Hear. Res.* 78: 1-10.

Hight N.G., McFadden S.L., Henderson D., Burkard R.F., Nicotera T. (2003) Noise-induced hearing loss in chinchillas pre-treated with glutathione monoethylester and R-PIA. *Hear Res.* 179: 21-32.

Himeno C., Komeda M., Izumikawa M., Takemura K., Yagi M., Weiping Y., Doi T., Kuriyama H., Miller J.M., Yamashita T. (2002) Intra-cochlear administration of dexamethasone attenuates aminoglycoside ototoxicity in the guinea pig. *Hear Res.* 167: 61-70.

Hirata H., Takahashi A., Kobayashi S., Yonehara S., Sawai H., Okazaki T., Yamamoto K., Sasada M. (1998) Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med.* 187: 587-600.

Hirose K., Discolo C.M., Keasler J.R., Ransohoff R. (2005) Mononuclear phagocytes migrate into the murine cochlea after acoustic trauma. *J Comp Neurol.* 489: 180-194.

Hölscher C. (1995) Development of beta-amyloid-induced neurodegeneration in Alzheimer's disease and novel neuroprotective strategies. *Rev Neurosci.* 16: 181-212.

Hou F., Wang S., Zhai S., Hu Y., Yang W., He L. (2003) Effects of alpha-tocopherol on noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Hear Res.* 179: 1-8.

Hu B.H., Guo W., Wang P.Y., Henderson D., Jiang S.C. (2000) Intense noise-induced apoptosis in hair cells of guinea pig cochleae. *Acta Otolaryngol.* 120: 19-24.

Hu B.H., Henderson D., Nicotera T.M. (2002) Involvement of apoptosis in progression of cochlear lesion following exposure to intense noise. *Hear Res.* 166: 62-71.

Hu B.H., Henderson D., Nicotera T.M. (2006) Extremely rapid induction of outer hair cell apoptosis in the chinchilla cochlea following exposure to impulse noise. *Hear Res.* 211: 16-25.

Hu B.H., Henderson D., Yang W.P. (2008) The impact of mitochondrial energetic dysfunction on apoptosis in outer hair cells of the cochlea following exposure to intense noise. *Hear Res.* 236: 11-21.

Hu B.H., Zheng X.Y., McFadden S.L., Kopke R.D., Henderson D. (1997) R-phenylisopropyladenosine attenuates noise-induced hearing loss in the chinchilla. *Hear Res.* 113: 198-206.

Huang T.J., Sayers N.M., Fernyhough P., Verkhratsky A. (2002) Diabetes-induced alterations in calcium homeostasis in sensory neurones of streptozotocin-diabetic rats are restricted to lumbar ganglia and are prevented by neurotrophin-3. *Diabetologia.* 45: 560-570.

Hudspeth A.J., Gillespie P.G. (1994) Pulling springs to tune transduction: adaptation by hair cells. *Neuron.* 12: 1-9.

Hunter-Duvar I.M. (1978) Reissner's membrane and endocytosis of cell debris. *Acta Otolaryngol Suppl.* 351: 24-32.

Hunter-Duvar I.M, Bredberg G. (1974) Effects of intense auditory stimulation: hearing losses and inner ear changes in the chinchilla. *J Acoust Soc Am.* 55: 795-801.

Hunter-Duvar I.M., Elliott D.N. (1972) Effects of intense auditory stimulation: hearing losses and inner ear changes in the squirrel monkey. *J acoust Soc Am.* 52: 1181-1192.

Ising H., Handrock M., Günther T., Fischer R., Dombrowski M. (1982) Increased noise trauma in guinea pigs through magnesium deficiency. *Arch Otorhynolaryngol.* 236: 139-146.

Israels L.G., Israels E.D. (1999) Apoptosis. *Stem Cells.* 17: 306-313.

Itoh N., Yonehara S., Ishii A., Yonehara M., Mizushima S., Sameshima M., Hase, A., Seto Y., Nagata S. (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell.* 66: 233-243.

Izumikawa M., Minoda R., Kawamoto K., Abrashkin K.A., Swiderski D.L., Dolan D.F., Brough D.E., Raphael Y. (2005) Auditory hair cell replacement and hearing improvement by *Atoh1* gene therapy in deaf mammals. *Nat Med.* 11: 271-276.

Jackson L.E., Silverstein H. (2002) Chemical perfusion of the inner ear. *Otolaryngol Clin North Am.* 35 : 639-653.

James M.F. (1992) Clinical use of magnesium infusions in anesthesia . *Anesth. Analg.* 74: 129-136.

Jenison G.L, Winbery S., Bobbin R.P. (1986) Comparative actions of quisqualate and N-methyl-D-aspartate, excitatory amino acid agonists, on guinea-pig cochlear potentials. *Comp Biochem Physiol C.* 84: 385-389.

Jeon S.J., Oshima K., Heller S., Edge A.S. (2007) Bone marrow mesenchymal stem cells are progenitors in vitro for inner ear hair cells. *Mol Cell Neurosci.* 34: 59-68.

Joachims Z., Babisch W., Ising H., Günther T., Handrock M. (1983) Dependence of noise-induced hearing loss upon perilymph magnesium concentration. *J Acoust Soc Am.* 74: 104-108.

Joachims Z., Ising H., Gunther T. (1987) Noise-induced hearing loss in humans as a function of serum Mg concentration. *Magnes Bull.* 9: 130-131.

Jürgensmeier J.M., Xie Z., Deveraux Q., Ellerby L., Bredesen D., Reed J.C. (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 4997-5002.

Kakehata S., Dallos P., Brownell W.E., Iwasa K.H., Kachar B., Kalinec F., Ikeda K., Takasaka T. (2000) Current concept of outer hair cell motility. *Auris Nasus Larynx.* 27: 349-355.

Kanduc D., Mittelman A., Serpico R., Sinigaglia E., Sinha A.A., Natale C., Santacroce R., Di Corcia M.G., Lucchese A., Dini L., Pani P., Santacroce S., Simone S., Bucci R., Farber E. (2002) Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol.* 21: 165-170.

Kannan K., Jain S.K. (2000) Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology.* 7: 153-163.

Kardilag T., Yalcin S., Ozturk A., Gok U., Kaygusuz I., Susaman N. 2002. The role of free oxygen radicals in noise-induced hearing loss: effect of melatonin and prednisolone. *Auris Nasus Larynx.* 29: 147-152.

Kawamoto K., Ishimoto S., Minoda R., Brough D.E., Raphael Y. (2003) Math1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs in vivo. *J Neurosci.* 23: 4395-4400.

Kawamoto K., Sha S.H., Minoda R., Izumikawa M., Kuriyama H., Schacht J., Raphael Y. (2004) Antioxidant gene therapy can protect hearing and hair cells from ototoxicity. *Mol Ther.* 9:173-181.

Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26: 239-257.

Kil J., Pierce C., Tran H, Gu R., Lynch E.D. (2007) Ebselen treatment reduces noise induced hearing loss via the mimicry and induction of glutathione peroxidase. *Hear Res.* 226: 44-51.

Kim M.J., Jo D.G., Hong G.S., Kim B.J., Lai M., Cho D.H., Kim K.W., Bandyopadhyay A., Hong Y.M., Kim D.H., Cho C., Liu J.O., Snyder S.H., Jung Y.K. (2002) Calpain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 9870-9875.

Kluck R.M., Bossy-Wetzel E., Green D.R., Newmeyer D.D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 275: 1132-1136.

Konig O., Winter E., Fuchs J., Haupt H., Mazurek B., Weber N. Gross J. (2003) Protective effect of magnesium and MK 801 on hypoxia-induced hair cell loss in new-born rat cochlea. *Magnes Res.* 16: 98-105.

Kopke R.D., Coleman J.K., Liu J., Campbell K.C., Riffenburgh R.H. (2002) Candidate's thesis: enhancing intrinsic cochlear stress defenses to reduce noise-induced hearing loss. *Laryngoscope.* 112:1515-1532.

Kopke R.D., Hoffer M.E., Wester D., O'Leary M.J., Jackson R.L. (2001) Targeted topical steroid therapy in sudden sensorineural hearing loss. *Otol Neurotol.* 22: 475-479.

Kopke R.D., Jackson R.L., Coleman J.K., Liu J., Bielefeld E.C., Balough B.J. (2007) NAC for noise: from the bench top to the clinic. *Hear Res.* 226: 114-125.

Kopke R.D., Weiskopf P.A., Boone J.L., Jackson R.L., Wester D.C., Hoffer M.E., Lambert D.C., Charon C.C., Ding D.L., McBride D. (2000) Reduction of noise-induced hearing loss using L-NAC and salicylate in the chinchilla. *Hear Res.* 149: 138-146.

Kramer S., Dreisbach L., Lockwood J., Baldwin K., Kopke R., Scranton S., O'Leary M. (2006) Efficacy of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) in protecting ears exposed to loud music. *J Am Acad Audiol.* 17 : 265-278.

Kroemer G. (1997) Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *Cell Death Differ.* 4: 443-456.

Labarère J., Lemardeley P., Vincey P., Desjeux G., Pascal B. (2000) Traumatismes sonores aigus en population militaire. *La presse médicale.* 29 : 1341-1344.

Lamm K., Arnold W. (1999) Successful treatment of noise-induced cochlear ischemia, hypoxia, and hearing loss. *Ann N Y Acad Sci.* 884: 233-248.

Lamm K., Arnold W. (2000) The effect of blood flow promoting drugs on cochlear blood flow, perilymphatic pO₂ and auditory function in the normal and noise-damaged hypoxic and ischemic guinea pig inner ear. *Hear Res.* 141: 199-219.

Lamm K., Arnold W. (1998) The effect of prednisolone and non-steroidal anti-inflammatory agents on the normal and noise-damaged guinea pig inner ear. *Hear Res.* 115: 149-161.

Le Mouel C., Renon P., Angot A., Suc B. (1981) Nos résultats thérapeutiques sur cinq années dans les traumatismes sonores aigus de la cochlée. *Med Armees.* 9 :449-452.

Le Prell C.G., Hughes L.F., Miller J.M. (2007) Free radical scavengers vitamins A, C, and E plus magnesium reduce noise trauma. *Free Radic Biol Med.* 42: 1454-1463.

Light J.P., Silverstein H. (2004) Transtympanic perfusion: indications and limitations. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 12 : 378-383.

Li H., Liu H., Heller S. (2003a) Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med.* 9: 1293- 1299.

Li H., Roblin G., Liu H., Heller S. (2003b) Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 13495-13500.

Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 94: 491-501.

Lim D.J. (1986a) Functional structure of the Organ of Corti: a review. *Hear Res*. 22: 117-146.

Lim D.J. (1986b) Cochlear micromechanics in understanding otoacoustic emission. *Scand Audiol Suppl*. 25: 17-25.

Lim D.J., Melnick, W. (1971) Acoustic damage of the cochlea. A scanning and transmission electron microscopic observation. *Arch Otolaryngol*. 94: 294-305.

Lipscomb D.M., Roettger R.L. (1973) Capillary constriction in cochlear and vestibular tissues during intense noise stimulation. *Laryngoscope*. 83: 259-263.

Lo A.C, Houenou L.J., Oppenheim R.W. (1995) Apoptosis in the nervous system: morphological features, methods, pathology, and prevention. *Arch Histol Cytol*. 58: 139-149.

Longthorne V.L., Williams G.T (1997) Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *Cell*. 16: 3805-3812.

Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 94: 481-490.

Luz G.A. (1970) Recovery from temporary threshold shift in monkeys exposed to impulse noise: evidence for a diphasic recovery process. *J Acoust Soc Am*. 48: 96(A).

Luz G.A., Hodge D.C. (1971) Recovery from impulse-noise induced TTS in monkeys and men: a descriptive model. *J Acoust Soc Am*. 49: 1770-1777.

Lynch E.D., Gu R., Pierce C., Kil J. (2004) Ebselen-mediated protection from single and repeated noise exposure in rat. *Laryngoscope*. 114: 333-337.

Lynch E.D., Kil J. (2005) Compounds for the prevention and treatment of noise-induced hearing loss. *Drug Discov Today*. 10: 1291-1298.

Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R.M. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 83: 835-839.

Mäntysalo S., Vuori J. (1984) Effects of impulse noise and continuous steady state noise on hearing. *Br J Ind Med*. 41 : 122-132.

Martin S.J., Reutelingsperger C.P., McGahon A.J., Rader J.A., van Schie R.C., LaFace D.M., Green D.R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*. 182: 1545-1556.

Masuda H., Chancellor M.B., Kihara K., Yoshimura N. (2006) 15-deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J₂ attenuates development of cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Urology*. 67: 435-439.

Masuda M., Nagashima R., Kanzaki S., Fujioka M., Ogita K., Ogawa K. (2005) Nuclear factor-kappa B nuclear translocation in the cochlea of mice following acoustic overstimulation. *Brain Res*. 1068 : 237-247.

Mattson M. P. (1996) Calcium and Free Radicals: Mediators of neurotrophic factor and excitatory transmitter-regulated developmental plasticity and cell death. *Perspect Dev Neurobiol*. 3: 79-91.

McCabe B.F. (1979) Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 88: 585-589.

McCall A.A., Swan E.E., Borenstein J.T., Sewell W.F., Kujawa S.G., McKenna M.J. (2009) Drug delivery for treatment of inner ear disease: Current State of Knowledge. *Ear Hear*. (En attente de publication).

McFadden S.L., Ohlemiller K.K., Ding D., Shero M., Salvi R.J. (2001) The Influence of Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Deficiencies on Noise-Induced Hearing Loss in Mice. *Noise Health*. 3: 49-64.

McFadden S.L., Woo J.M., Michalak N., Ding D. (2005) Dietary vitamin C supplementation reduces noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Hear Res*. 202: 200-208.

Miller J.D., Watson C.S., Covel W.P. (1963) Deafening effects of noise on the cat. *Acta Oto-laryngol*. 176: 1-91.

Miller J.M., Brown J.N., Schacht J. (2003) 8-iso-prostaglandin F(2alpha), a product of noise exposure, reduces inner ear blood flow. *Audiol Neurootol*. 8: 207-221.

Miller J.M., Yamashita D., Minami S., Yamasoba T., Le Prell C.G. (2006) Mechanisms and prevention of noise-induced hearing loss. *Otol Jpn*. 16: 139-153.

Mills D. et Rubel E. (1996) Development of the cochlear amplifier. *J Acoust. Soc. Am*. 100: 428-441.

Minami S.B., Yamashita D., Schacht J., Miller J.M. (2004) Calcineurin activation contributes to noise-induced hearing loss. *J Neurosci Res*. 78: 383-392.

Minoda R., Izumikawa M., Kawamoto K., Raphael Y. (2004) Strategies for replacing lost cochlear hair cells. *Neuroreport*. 145: 1089-1092.

Miyakita T., Hellström P.A., Frimanson E., Axelsson A. (1992) Effect of low level acoustic stimulation on temporary threshold shift in young humans. *Hear. Res*. 60: 149-155.

Morgan E.T., Li-Masters T., Cheng P.Y. (2002) Mechanisms of cytochrome P450 regulation by inflammatory mediators. *Toxicology*. 181-182: 207-210.

Mori T., Fujimura K., Yoshida M., Suzuki H. (2004) Effects of glucocorticoid receptor antagonist on CAPs threshold shift due to short-term sound exposure in guinea pigs. *Auris Nasus Larynx*. 31: 395-399.

Mori A., Kaminuma O., Suko M., Inoue S., Ohmura T., Hoshino A., Asakura Y., Miyazawa K., Yokota T., Okumura Y., Ito K., Okudaira H. (1997) Two distinct pathways of interleukin-5 synthesis in allergen-specific human T-cell clones are suppressed by glucocorticoids. *Blood*. 89: 2891-2900.

Moulin A. et Collet L. (1996) Les otoémissions acoustiques en exploration fonctionnelle. Ed. Médicales internationales. 157p.

Muzio M., Chinnaiyan A.M., Kischkel F.C., O'Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz J.D, Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E., Dixit V.M. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell*. 85: 817-827.

Nakagawa T., Kim T.S., Murai N., Endo T., Iguchi F., Tateya I., Yamamoto N., Naito Y., Ito J. (2003) A novel technique for inducing local inner ear damage. *Hear Res*. 176: 122-127.

Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A., Yuan J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 403: 98-103.

Nakao N., Kokaia Z., Odin P., Lindvall O. (1995) Protective effects of BDNF and NT-3 but not PDGF against hypoglycemic injury to cultured striatal neurons. *Exp Neurol*. 131: 1-10.

Nakashima T., Naganawa S., Sone M., Tominaga M., Hayashi H., Yamamoto H., Liu X., Nuttall A.L. (2003) Disorders of cochlear blood flow. *Brain Res Rev*. 43: 17-28.

Nelson D.I., Nelson R.Y., Concha-Barrientos M., Fingerhut M. (2005) The global burden of occupational noise-induced hearing loss. *Am J Ind Med*. 48: 446-458.

Nicotera T., Henderson D., Zheng X.Y., Ding D.L., Mc Fadden, S.L. (1999) Reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in noise-exposed cochleas of chinchillas. *Assoc Res Otolaryngol*. 626.

- Nicotera T.M., Hu B.H., Henderson D. (2003) The caspase pathway in noise-induced apoptosis of the chinchilla cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol.* 4: 466-477.
- Niedermeyer H.P., Zahneisen G., Luppá P., Busch R., Arnold W. (2003) Cortisol levels in the human perilymph after intravenous administration of prednisolone. *Audiol neurootol.* 8: 316-321.
- Nilsson P., Rydmarker S., Grenner J. (1987) Impulse noise and continuous noise of equivalent frequency spectrum and total sound energy. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 441: 45-58.
- Niu X., Shao R., Canlon B. (2003) Suppression of apoptosis occurs in the cochlea by sound conditioning. *Neuroreport.* 14: 1025-1029.
- Niu X., Tahera Y., Canlon B. (2004) Protection against acoustic trauma by forward and backward sound conditioning. *Audiol. Neurootol.* 9: 265-273.
- Noguchi N., Yoshida Y., Kaneda H., Yamamoto Y., Niki E. (1992) Action of ebselen as an antioxidant against lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* 44: 39-44.
- Norena A.J., Eggermont J.J. (2005) Enriched acoustic environment after noise trauma reduces hearing loss and prevents cortical map reorganization. *J. Neurosci.* 25: 699-705.
- Norena A.J., Eggermont J.J. (2006) Enriched acoustic environment after noise trauma abolishes neural signs of tinnitus. *Neuroreport.* 17: 559-563.
- Novelli G.P. (1997) Role of free radicals in septic shock. *J Physiol Pharmacol.* 48: 517-527.
- Nowak L., Bregestovski P., Ascher P., Herbet A., Prochiantz A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature.* 307 : 462- 465.

Oehm A., Behrmann I., Falk W., Pawlita M., Maier G., Klas C., Li-Weber M., Richards S., Dhein J., Trauth B.C. (1992) Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem.* 277: 10709-10715.

Ohinata Y., Miller J.M., Altschuler R.A., Schacht J. (2000a) Intense noise induces formation of vasoactive lipid peroxidation products in the cochlea. *Brain Res.* 878: 163-173.

Ohinata Y., Miller J.M., Schacht J. (2003) Protection from noise-induced lipid peroxidation and hair cell loss in the cochlea. *Brain Res.* 966: 265-273.

Ohinata Y., Yamasoba T., Schacht J., Miller J.M. (2000b) Glutathione limits noise-induced hearing loss. *Hear Res.* 146: 28-34.

Ohlemiller K.K. (2008) Recent findings and emerging questions in cochlear noise injury. *Hear Res.* 245: 5-17.

Ohlemiller K.K., McFadden S.L., Ding D.L., Flood D.G., Reaume A.G., Hoffman E.K., Scott R.W., Wright J.S., Putcha G.V., Salvi R.J. (1999) Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (Sod1) increases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Audiol Neurootol.* 4:237-246.

Ohlemiller K.K., McFadden S.L., Ding D.L., Lear P.M., Ho Y.S. (2000) Targeted mutation of the gene for cellular glutathione peroxidase (Gpx1) increases noise-induced hearing loss in mice. *J Assoc Res Otolaryngol.* 1: 243-254.

Okuda T., Sugahara K., Takemoto T., Shimogori H., Yamashita H. (2005) Inhibition of caspases alleviates gentamicin-induced cochlear damage in guinea pigs. *Auris Nasus Larynx.* 32: 33-37.

Oshima K, Grimm CM, Corrales CE, Senn P, Martinez Monedero R, Géléoc GS, Edge A, Holt JR, Heller S. (2007) Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol.* 8: 18-31.

Parker M.A., Corliss D.A., Gray B., Anderson J.K., Bobbin R.P., Snyder E.Y., Cotanche D.A. (2007) Neural stem cells injected into the sound-damaged cochlea migrate throughout the cochlea and express markers of hair cells, supporting cells, and spiral ganglion cells. *Hear Res.* 232: 29-43.

Parker M.A., Cotanche D.A. (2004) The potential use of stem cells for cochlear repair. *Audiol Neurootol.* 9: 72-80.

Parnes L.S., Sun A.H., Freeman D.J. (1999) Corticosteroid pharmacokinetics in the inner ear fluids: an animal study followed by clinical application. *Laryngoscope.* 109:1-17.

Pekkarinen J. (1995) Noise, impulse noise, and other physical factors: combined effects on hearing. *Occup Med.* 10: 545-559.

Perlman H.B., Kimura R. (1962) Cochlear blood flow in acoustic trauma. *Acta Otolaryngol.* 54 : 99-110.

Pignol B., Auvin S., Carré D., Marin J.G., Chabrier P.E. (2006) Calpain inhibitors and antioxidants act synergistically to prevent cell necrosis: effects of the novel dual inhibitors (cysteine protease inhibitor and antioxidant) BN 82204 and its pro-drug BN 82270. *J Neurochem.* 98: 1217-1228.

Pirvola U., Hallböök F., Xing-Qun L., Virkkala J., Saarma M., Ylikoski J. (1997) Expression of neurotrophins and Trk receptors in the developing, adult, and regenerating avian cochlea. *J Neurobiol.* 33: 1019-1033.

Pirvola U., Xing-Qun L., Virkkala J., Saarma M., Murakata C., Camoratto A.M., Walton K.M., Ylikoski J. (2000) Rescue of hearing, auditory hair cells, and neurons by CEP-1347/KT7515, an inhibitor of c-Jun N-terminal kinase activation. *J Neurosci.* 20:43-50.

Picciotti P.M., Fetoni A.R., Paludetti G., Wolf F.I., Torsello A., Troiani D., Ferraresi A., Pola R., Sergi B. (2006) Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in noise-induced hearing loss. *Hear Res.* 214: 76-83.

- Plontke S., Löwenheim H., Preyer S., Leins P., Dietz K., Koitschev A., Zimmermann R., Zenner H.P. (2005) Outcomes research analysis of continuous intratympanic glucocorticoid delivery in patients with acute severe to profound hearing loss: basis for planning randomized controlled trials. *Acta Otolaryngol.* 125: 830-839.
- Pourbakht A., Yamasoba T. (2003) Ebselen attenuates cochlear damage caused by acoustic trauma. *Hear Res.* 181: 100-108.
- Prazma J., Smalley W.E., Covington S., Pillsbury H.C. (1988) Cochlear blood flow. The effect of six hours of noise exposure. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 114: 657-660.
- Psillas G., Pavlidis P., Karvelis I., Kekes G., Vital V., Constantinidis J. (2008) Potential efficacy of early treatment of acute acoustic trauma with steroids and piracetam after gunshot noise. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 265 : 1465- 1469.
- Puel J.L., Ladrech S., Chabert R., Pujol R., Eybalin, M. (1991) Electrophysiological evidence for the presence of NMDA receptors in the guinea pig cochlea. *Hear Res.* 51: 255-264.
- Puel J.L., Ruel J., Gervais d'Aldin C., Pujol R. (1998) Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss. *Neuroreport.* 9: 2109-2114.
- Puel J.L., Saffiedine S., Gervais d'Aldin C., Eybali M., Pujol R. (1995) Synaptic regeneration and functional recovery after excitotoxic injury in the guinea pig cochlea. *C R Acad Sci III.* 318: 67-75.
- Pujol R. (1989) Anatomy and physiology of the cochlea. *Arch Int Physiol Biochim,* 97: 51-78.
- Pujol R., Puel J.L. (1999) Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: a review of recent findings. *Ann N Y Acad Sci.* 884: 249-254.
- Quirk W.S., Avinash G., Nuttall A.L., Miller J.M. (1992) The influence of loud sound on red blood cell velocity and blood vessel diameter in the cochlea. *Hear Res.* 63: 102-107.

Quirk W.S., Seidman M.D. (1995) Cochlear vascular changes in response to loud noise. *Am J Otol.* 16: 322-325.

Quirk W.S., Shivapuja B.G., Schwimmer C.L., Seidman M.D. (1994) Lipid peroxidation inhibitor attenuates noise-induced temporary threshold shifts. *Hear Res.* 74: 217-220.

Raphael Y., Altschuler R.A. (2003) Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull.* 60:397-422.

Rarey K.E., Curtis L.M. (1996) Receptors for glucocorticoids in the human inner ear. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 115: 38-41.

Rarey K.E., Gerhardt K.J., Curtis L.M., ten Cate W.J. (1995) Effect of stress on cochlear glucocorticoid protein: acoustic stress. *Hear Res.* 82: 135-138.

Ravishankar S., Ashraf Q.M., Fritz K., Mishra O.P., Delivoria-Papadopoulos M. (2001) Expression of Bax and Bcl-2 proteins during hypoxia in cerebral cortical neuronal nuclei of newborn piglets: effect of administration of magnesium sulfate. *Brain Res.* 901: 23-29.

Ruel J., Chen C., Pujol R., Bobbin R.P., Puel J.L. (1999) AMPA-preferring glutamate receptors in cochlear physiology of adult guinea-pig. *J Physiol.* 518: 667-680.

Satoh H., Firestein G.S., Billings P.B., Harris J.P., Keithley E.M. (2002) Tumor necrosis factor-alpha, an initiator, and etanercept, an inhibitor of cochlear inflammation. *Laryngoscope.* 112: 1627-1634.

Schaaf M.J., Hoetelmans R.W., de Kloet E.R., Vreugdenhil E. (1997) Corticosterone regulates expression of BDNF and trkB but not NT-3 and trkC mRNA in the rat hippocampus. *J Neurosci Res.* 48: 334-341.

Scheibe F., Haupt H., Ising H. (2000) Preventive effect of magnesium supplement on noise-induced hearing loss in the guinea pig. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 257: 10-16.

Scheibe F., Haupt H., Ising H., Cherny L. (2002) Therapeutic effect of parenteral magnesium on noise-induced hearing loss in the guinea pig. *Magnes Res.* 15: 27-36.

Scheibe F., Haupt H., Mazurek B., König O. (2001) Therapeutic effect of magnesium on noise-induced hearing loss. *Noise Health.* 3: 79-84.

Schreiner L. (1963) Studies with labelled substances on the patency of the aquaeductus cochleae. *Arch Ohren Nasen Kehlkopfheilkd.* 9 : 587-590.

Schwartz L.M., Smith S.W., Jones M.E., Osborne B.A. (1993) Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 980-984.

Searle J., Kerr J.F., Bishop C.J. (1982) Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* 17:229-259.

Seidman M., Babu S., Tang W., Naem E., Quirk W.S. (2003) Effects of resveratrol on acoustic trauma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 129: 463-470

Seidman M.D., Quirk W.S., Shirwany N.A. (1999) Mechanisms of alterations in the microcirculation of the cochlea. *Ann N Y Acad Sci.* 884: 226-232.

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: 1052-1056.

Seidman M.D., Vivek P. (2004) Intratympanic treatment of hearing loss with novel and traditional agents. *Otolaryngol Clin North Am.* 37 : 973-990.

Sendowski I., Brallon-Cros A., Delaunay C., Buguet A. (2003) Traumatisme sonore par bruit d'arme : mise en place du laboratoire au CRSSA ; mise au point du modèle expérimental ; efficacité des corticoïdes administrés

par voie générale ; étude de la récupération spontanée et mise en évidence d'un indice de susceptibilité chez l'animal. Rapport DGA-CO n° 9810076.

Sendowski I., Abamrane L., Raffin F., Cros A., Clarençon D. (2006a) Therapeutic efficacy of intra-cochlear administration of methylprednisolone after acoustic trauma caused by gunshot noise in guinea pigs. *Hearing Res.* 221: 119-127.

Sendowski I., Raffin F., Brailon-Cros A. (2006b) Therapeutic efficacy of magnesium after acoustic trauma caused by gunshot noise in guinea pigs. *Acta Otolaryngol.* 126: 122-129.

Sha S.H., Qiu J.H., Schacht J. (2006) Aspirin to prevent gentamicin-induced hearing loss. *N Engl J Med.* 354: 1856-1857.

Sha S.H., Zajic G., Epstein C.J., Schacht J. (2001) Overexpression of copper/zinc-superoxide dismutase protects from kanamycin-induced hearing loss. *Audiol Neurootol.* 6: 117-123.

Sharikabad M., Ostbye K., Lyberg T., Brors O. (2001) Effect of extracellular Mg²⁺ on ROS and Ca²⁺ accumulation during reoxygenation of rat cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280: H344-H353.

Shibasaki F., McKeon F. (1995) Calcineurin functions in Ca(2+)-activated cell death in mammalian cells. *J Cell Biol.* 131: 735-743.

Shibasaki F., Kondo E., Akagi T., McKeon F. (1997) Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature.* 386: 728-731.

Shirwany N.A., Seidman M.D., Tang W. (1998) Effect of transtympanic injection of steroids on cochlear blood flow, auditory sensitivity, and histology in the guinea pig. *Am J Otol.* 19: 230-235.

Shoji F., Miller A.L., Mitchell A., Yamasoba T., Altschuler R.A., Miller J.M. (2000) Differential protective effects of neurotrophins in the attenuation of noise-induced hair cell loss. *Hear Res.* 146: 134-142.

Silverstein H. (1999) Use of a new device, the MicroWick, to deliver medication to the inner ear. *Ear Nose Throat J.* 78 : 595-598.

Simizu S., Shibasaki F., Osada H. (2000) Bcl-2 inhibits calcineurin-mediated Fas ligand expression in antitumor drug-treated baby hamster kidney cells. *Jpn J Cancer Res.* 91: 706-714.

Slepecky N., Hamernik R., Henderson D., Coling D. (1982) Correlation of audiometric data with changes in cochlear hair cell stereocilia resulting from impulse noise trauma. *Acta Otolaryngol.* 93: 329-340.

Smith C.A. (1957) Structure of the stria vascularis and the spiral prominence. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 66: 521-536.

Sorimachi H., Ishiura S., Suzuki K. (1997) Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.* 328: 721-732.

Spicer S.S, Schulte B.A. (1991) Differentiation of inner ear fibrocytes according to their ion transport related activity. *Hear Res.* 56: 53-64.

Spoendlin H. (1971) Primary structural changes in the organ of Corti after acoustic overstimulation. *Acta Otolaryngol.* 71 :166-176.

Srivastava R.K., Sasaki C.Y., Hardwick J.M., Longo D.L. (1999) Bcl-2-mediated drug resistance: inhibition of apoptosis by blocking nuclear factor of activated T lymphocytes (NFAT)-induced Fas ligand transcription. *J Exp Med.* 190: 253-265.

Suc B., Asperge A. (1988) Les acouphènes des traumatismes sonores aigus par FAMAS. *Médecine et Armées.* 16 : 207-210.

Suc B., Poulet M., Asperge A., Vix J., Barberot J.P., Doucet F. (1994) Clinical development of acute noise-induced acoustic trauma. An evaluation of a study of 250 cases. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac.* 111: 319-324.

Starck J., Toppila E., Pyykkö I. (2003) Impulse noise and risk criteria. *Noise&Health*. 5 : 63-73.

Sugahara K., Shimogori H., Yamashita H. (2001) The role of acidic fibroblast growth factor in recovery of acoustic trauma. *Neuroreport*. 12: 3299-3302.

Swan E.E., Mescher M.J., Sewell W.F., Tao S.L., Borenstein J.T. (2008) Inner ear drug delivery for auditory applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 60: 1583-1599.

Tahera Y., Meltser I., Johansson P., Bian Z., Stierna P., Hansson A.C., Canlon B. (2006) NF-kappaB mediated glucocorticoid response in the inner ear after acoustic trauma. *J Neurosci Res*. 83:1066-1076.

Tang W., Seidman M.D., Henig J.P., Shulman A., Stracher A. (2001) The effects of leupeptin on cochlear blood flow, auditory sensitivity, and histology. *Int Tinnitus J*. 7: 4-12.

Takahashi K., Kusakari J., Kimura S., Wada T., Hara A. (1996) The effect of methylprednisolone on acoustic trauma. *Acta Otolaryngol*. 116: 209-212.

Takahashi T., Kimoto T., Tanabe N., Hattori T.A., Yasumatsu N., Kawato S. (2002) Corticosterone acutely prolonged N-methyl-d-aspartate receptor-mediated Ca²⁺ elevation in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurochem*. 83: 1441-1451.

Takemura K., Komeda M., Yagi M., Himeno C., Izumikawa M., Doi T., Kuriyama H., Miller J.M., Yamashita T. (2004) Direct inner ear infusion of dexamethasone attenuates noise-induced trauma in guinea pig. *Hear Res*. 196: 58-68.

Tan C.T., Hsu C.J., Lee S.Y., Liu S.H., Lin-Shiau S.Y. (2001) Potentialisation of noise-induced hearing loss by amikacin in guinea pigs. *Hear Res*. 161: 72-80.

Tanaka C., Chen G., Hu B., Chi L., Li M., Zheng G., Bielefeld E., Jamesdaniel S., Coling D., Henderson D. (2009) The effects of acoustic environment after traumatic noise exposure on hearing and outer hair cells. *Hear. Res.* 250: 10-18.

Tang W., Seidman M.D., Henig J.P., Shulman A., Stracher A. (2001) The effects of leupeptin on cochlear blood flow, auditory sensitivity, and histology. *Int Tinnitus J.* 7: 4-12.

Terunuma T., Hara A., Senarita M., Motohashi H., Kusakari J. (2001) Effect of acoustic overstimulation on regulation of glucocorticoid receptor mRNA in the cochlea of the guinea pig. *Hear Res.* 151: 121-124.

Thorne P.R., Nuttall A.L. (1987) Laser Doppler measurements of cochlear blood flow during loud sound exposure in the guinea pig. *Hear Res.* 27: 1-10.

Tobita T., Senarita M., Hara A., Kusakari J. (2002) Determination of prednisolone in the cochlear tissue. *Hear Res.* 165: 30-34

Tornabene S. V., Sato K, Pham L., Billings P., Keithley E. M. (2006) Immune cell recruitment following acoustic trauma. *Hear res.* 222: 115-124.

Trautwein P., Hofstetter P., Wang J., Salvi R., Nostrand A. (1996) Selective inner hair cell loss does not alter distortion product otoacoustic emissions. *Hear Res.* 1-2: 71-82.

Turrens J.F., Alexandre A., Lehninger A.L. (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 237: 408-414.

Uemaetomari I., Tabuchi K., Hoshino T., Hara A. (2005) Protective effect of calcineurin inhibitors on acoustic injury of the cochlea. *Hear Res.* 209: 86-90.

Usami S., Hjelle O.P., Ottersen O.P. (1996) Differential cellular distribution of glutathione-an endogenous antioxidant-in the guinea pig inner ear. *Brain Res.* 743: 337-340.

Vander Heiden M.G., Chandel N.S., Williamson E.K., Schumacker P.T., Thompson C.B. (1997) Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*. 91: 627-637.

Verret C., Matras-Maslin V., Haus-Cheymol R., Berger F., Texier G., Decam C., Poncet J.L., Spiegel A. (2005) Traumatismes sonores aigus dans les armées. Résultats de la surveillance épidémiologique de 2002 à 2004. Rapport technique 823/EVDG/DESPN/SSA.

Vincenz C., Dixit V.M. (1997) Fas-associated death domain protein interleukin-1beta-converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling. *J Biol Chem*. 272: 6578-6583.

Vlincey P., Mechinou Y., Lafond P. (1988) L'hémodilution normovolémique intentionnelle dans le traitement des traumatismes sonores aigus. Etude comparative. *Med Armees*. 16 :217-221.

Wang Y., Liberman M.C. (2002) Restraint stress and protection from acoustic injury in mice. *Hear Res*. 165: 96-102.

Wang J., Ding D., Shulman A., Stracher A., Salvi R.J. (1999b) Leupeptin protects sensory hair cells from acoustic trauma. *Neuroreport*. 10: 811-816.

Wang H.G., Pathan N., Ethell I.M., Krajewski S., Yamaguchi Y., Shibasaki F., McKeon F., Bobo T., Franke T.F., Reed J.C. (1999a) Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*. 284: 339-343.

Wang J., Van De Water T.R., Bonny C., de Ribaupierre F., Puel J.L., Zine A. (2003) A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against both aminoglycoside and acoustic trauma-induced auditory hair cell death and hearing loss. *J Neurosci*. 23: 8596-8607.

Wang H., Ward N., Boswell M., Katz D.M. (2006) Secretion of brain-derived neurotrophic factor from brain microvascular endothelial cells. *Eur J Neurosci*. 23: 1665-1670.

Wangemann P., Liu J., Schimozono M., Schimanski S., Scofield M. A. (2000) K⁺ secretion in strial marginal cells is stimulated via beta 1-adrenergic receptors but not via beta 2-adrenergic or vasopressin receptors. *J Membr Biol.* 175:191-202.

Ward W.D., Duvall A.J. (1971) Behavioral and ultrastructural correlates of acoustic trauma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 80 : 881-896.

Wei X., Zhao L., Liu J., Dodel R.C., Farlow M.R., Du Y. (2005) Minocycline prevents gentamicin-induced ototoxicity by inhibiting p38 MAP kinase phosphorylation and caspase 3 activation. *Neuroscience.* 131: 513-521.

Woods C., Montcouquiol M., Kelley M.W. (2004) Math1 regulates development of the sensory epithelium in the mammalian cochlea. *Nat Neurosci.* 7: 1310-1318.

Xiang J., Chao D.T., Korsmeyer S.J. (1996) BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 14559-14563.

Yamane H., Nakai Y., Takayama M., Iguchi H., Nakagawa T., Kojima A. (1995) Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise-induced acoustic trauma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 252 : 504-508.

Yamashita D., Jiang H.Y., Le Prell C.G., Schacht J., Miller J.M. (2005a) Post-exposure treatment attenuates noise-induced hearing loss. *Neuroscience.* 134: 633-642.

Yamashita D., Minami, S., Ogawa, K., Miller, J.M. (2005b) Bcl-2 genes regulate noise-induced hearing loss. *Abs Assoc Res Otolaryngol.* 28: 201.

Yamashita D., Jiang H.Y., Schacht J., Miller J.M. (2004) Delayed production of free radicals following noise exposure. *Brain Res.* 1019: 201-209.

Yamasoba T., Altschuler R.A., Raphael Y., Miller A.L., Shoji F., Miller J.M. (2001) Absence of hair cell protection by exogenous FGF-1 and FGF-2 delivered to guinea pig cochlea in vivo. *Noise Health.* 3:65-78.

Yamasoba T., Harris C., Shoji F., Lee R.J., Nuttall A.L., Miller J.M.(1998) Influence of intense sound exposure on glutathione synthesis in the cochlea. *Brain Res.* 804: 72-78.

Yamasoba T., Pourbakht A., Sakamoto T., Suzuki M. (2005) Ebselen prevents noise-induced excitotoxicity and temporary threshold shift. *Neurosci Lett.* 380: 234-238.

Yamasoba T., Schacht J., Shoji F., Miller J.M. (1999) Attenuation of cochlear damage from noise trauma by an iron chelator, a free radical scavenger and glial cell line-derived neurotrophic factor in vivo. *Brain Res.* 15: 317-325.

Yamasoba T., Kondo K. (2006) Supporting cell proliferation after hair cell injury in mature guinea pig cochlea in vivo. *Cell Tissue Res.* 325: 23-31.

Yang W.P., Henderson D., Hu B.H., Nicotera T.M. (2004) Quantitative analysis of apoptotic and necrotic outer hair cells after exposure to different levels of continuous noise. *Hear Res.* 196: 69-76.

Yang X.F., Weber G.F., Cantor H. (1997) A novel Bcl-x isoform connected to the T cell receptor regulates apoptosis in T cells. *Immunity.* 7(5): 629-639.

Ylikoski J., Pirvola U., Moshnyakov M., Palgi J., Arumäe U., Saarma M. (1993) Expression patterns of neurotrophin and their receptor mRNAs in the rat inner ear. *Hear Res.* 65: 69-78.

Ylikoski J., Pirvola U., Virkkala J., Suvanto P., Liang X.Q., Magal E., Altschuler R., Miller J.M., Saarma M. (1998) Guinea pig auditory neurons are protected by glial cell line-derived growth factor from degeneration after noise trauma. *Hear Res.* 14: 17-26.

Zakeri Z., Bursch W., Tenniswood M., Lockshin R.A.(1995) Cell death: programmed, apoptosis, necrosis, or other? *Cell Death Differ.* 2: 87-96.

Zamzami N., Susin S.A., Marchetti P., Hirsch T., Gómez-Monterrey I., Castedo M., Kroemer G. (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 183:1533-1544.

Zenner H. P. (1986) Ménière's disease: pathologic contraction and depolarization of the hair cells of the cochlea induced by potassium ion. *Rev Laryngol Otol Rhinol.* 107: 53-55.

Zhai S.Q., Wang D.J., Wang J.L., Han D.Y., Yang W.Y. (2004) Basic fibroblast growth factor protects auditory neurons and hair cells from glutamate neurotoxicity and noise exposure. *Acta Otolaryngol.* 124: 124-129.

Zhao Y.M., Chen S.S, Cheng X.R., Li Y.Q. (2005) Relationship between impulse noise and continuous noise inducing hearing loss by dosimeter measurement in working populations. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi.* 39: 396-399.

Zhang M., Liu W., Ding D., Salvi R. (2003) Pifithrin-alpha suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis. *Neuroscience.* 120: 191-205.

Zhang Y.M., Ma B., Gao W.Y., Wen W., Liu H.Y. (2007) Role of glutamate receptors in the spiral ganglion neuron damage induced by acoustic noise. *Sheng li Xue Bao.* 59: 103-110.

Zheng J.L., Gao W.Q. (2000) Overexpression of Math1 induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears. *Nat Neurosci.* 3: 580-586.

Zheng J., Shen W., He D.Z., Long K.B., Madison L.D., Dallos P. (2000) Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature.* 405: 149-155.

Zhou A., Scoggin S., Gaynor R.B., Williams N.S. (2003) Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene.* 22: 2054-2064.

Zhou J.Z., Zheng J.Q., Zhang Y.X., Zhou J.H. (2000) Corticosterone impairs cultured hippocampal neurons and facilitates Ca²⁺ influx through voltage-dependent Ca²⁺ channel. *Acta pharmacol Sin.* 21: 156-160.

ANNEXES

ANNEXE 1

METHODOLOGIE GENERALE : matériels et méthodes communs aux différentes études.

1. Traumatisme sonore par bruit d'arme

Le traumatisme sonore, réalisé en chambre sourde anéchoïque (Photo 1), est obtenu en exposant l'animal à 3 tirs à blanc du fusil d'assaut FAMAS F1. Le cobaye, légèrement anesthésié, est placé dans un hamac à une distance déterminée pour obtenir le niveau sonore voulu (60 cm du canon pour 170 dB SPL valeur crête). Un microphone (1/8 "B&K type 4231), dont la membrane est placée parallèlement au tympan de l'animal, permet d'estimer le bruit perçu au niveau de l'oreille. Les mesures acoustiques du bruit impulsionnel suivent les recommandations faites par la Direction Générale de l'Armement (DGA). Le signal est conditionné (*Nexus*, B&K) et enregistré sur le système Odyssee (OD200 - 10 Mech/s). La figure 2 représente l'onde sonore obtenue (traumatisme à 170 dB SPL) et l'analyse temps-fréquence correspondante, par la méthode des ondelettes de Morlet (logiciel *SignalLab*; RMS, Aix en Provence, France). L'onde sonore de l'arme se caractérise par un front de montée extrêmement rapide ($<10 \mu\text{s}$) et une durée (T_A) d'environ 0,4 ms (Starck et coll., 2003). Le spectre fréquentiel est étendu, avec une intensité particulièrement élevée vers 5 et 20 kHz.

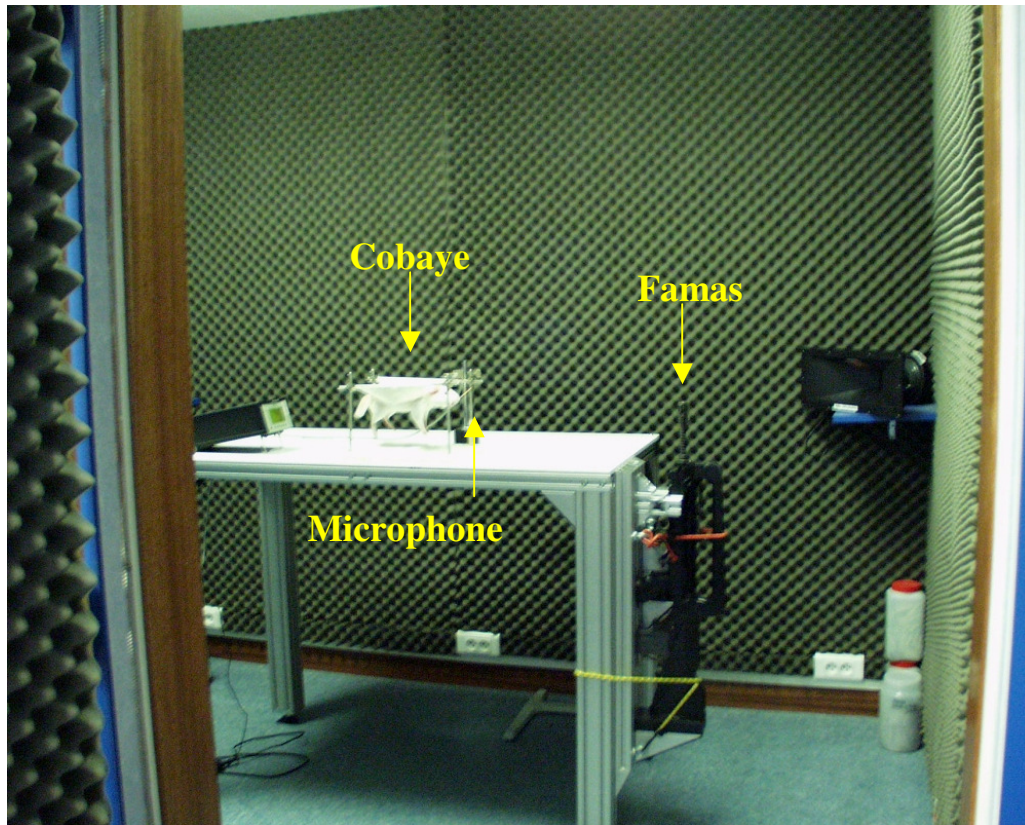


Photo 1 : Traumatisme sonore par bruit d'arme.

Les traumatismes sonores sont réalisés en chambre sourde anéchoïque en plaçant l'animal anesthésié à une distance donnée du canon d'un FAMAS chargé à blanc.

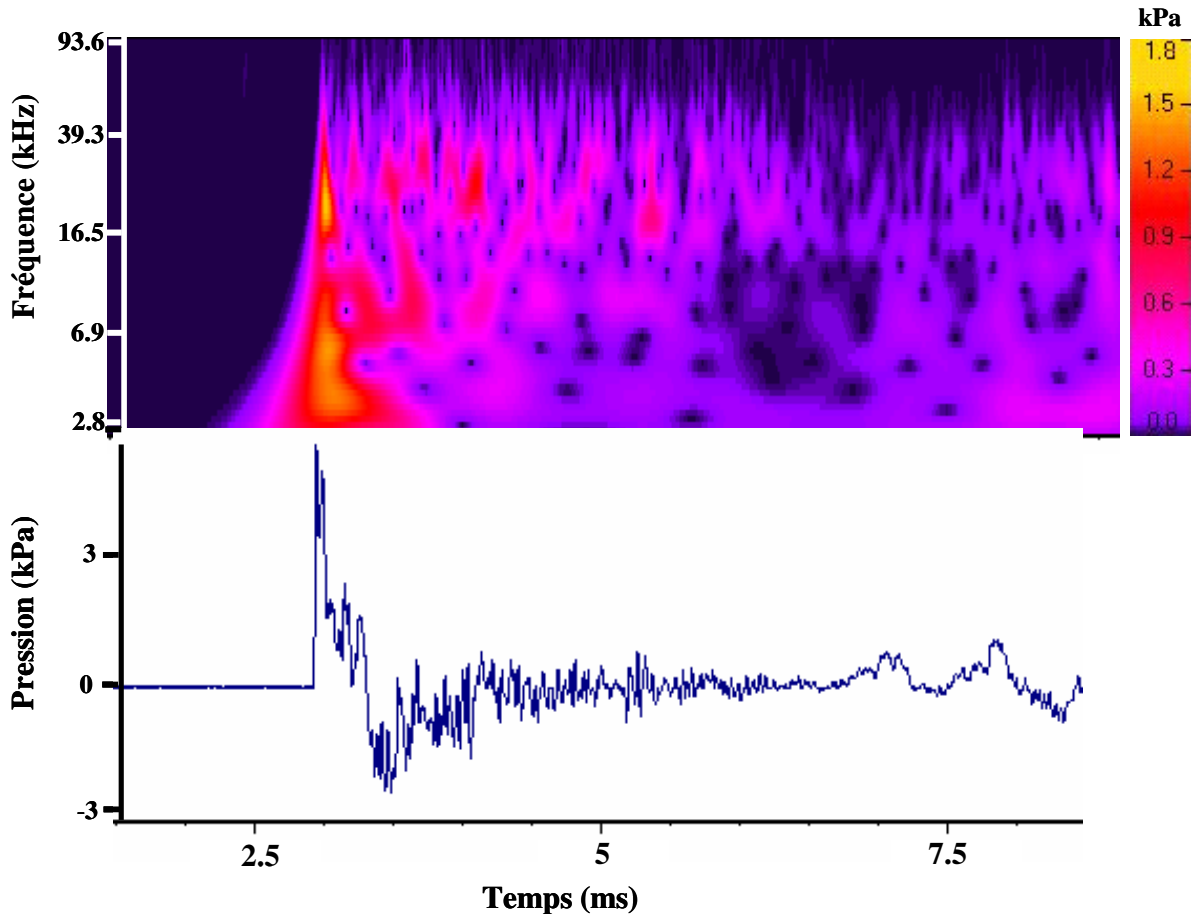


Figure 20 : Onde sonore (kPa) et spectre fréquentiel (kHz) pour un bruit de Famas de 170 dB SPL (pic)

2. Réalisation de l'électrocochléographie

Les seuils auditifs sont étudiés pour 12 fréquences (2 - 2,8 - 4 - 5,6 - 8 - 9,5 - 11,3 - 23,5 - 16 - 19 - 22- 32 kHz) sous légère anesthésie (Zoletil® 50 mg/kg en injection intra-péritonéale), la température corporelle de l'animal étant maintenue à $38^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Le matériel utilisé pour générer les stimuli sonores et recueillir le potentiel d'action composite (PAC) comprend 2 microprocesseurs et un atténuateur programmable (système 3 - Tucker-Davis Technologies TDT - Gainesville, FL, USA). Les stimuli sonores consistent en des bouffées de son pur (durée 13 ms, temps de montée 1,5 ms), présentées 15 fois par secondes. L'intensité sonore varie de 0 à 90 dB SPL par pas de 5 dB. La réponse cochléaire est amplifiée ($\times 100000$) par un amplificateur biologique différentiel (Grass RPS 107), filtrée (1 Hz - 3 kHz), moyennée sur

256 échantillons et enregistrée sur PC. Le seuil auditif est considéré comme l'intensité sonore minimale pour laquelle apparaît une réponse physiologique, bien distincte du bruit électrique, et correspondant au signal observé à plus forte intensité.

Avant chaque test, le système est calibré grâce à un conditionneur Brüel and Kjaer (B&K - nexus , BP 140 kHz) relié à un microphone 1/2 pouce (B&K type 4191). Au cours de la calibration, chaque stimulus est enregistré sur un enregistreur numérique (Odyssey, OD100 Nicolet technologies), la fréquence et l'intensité sont analysées par un logiciel spécifique (*Proview* - Nicolet technologies).

3. Analyse histologique de la cochlée

A l'issue de l'expérimentation, les animaux sont sacrifiés pour un prélèvement cochléaire. Après anesthésie profonde par injection de pentobarbital sodique (Dolethal[®], 500 mg/kg), les cochlées sont prélevées rapidement. Une solution de succinate deshydrogénase contenant 2,5 ml de succinate de sodium 0,2 M, 2,5 ml de tampon phosphate 0,2M (pH 7,6) et 5 ml de bleu de tétrazolium à 0,1%, est perfusée par les fenêtres cochléaires. Les cochlées sont alors placées dans cette solution à 37°C durant une heure, puis fixées dans du formalin à 10 % durant plus de 24 heures. Elles sont disséquées sous loupe binoculaire pour prélever l'organe de Corti de l'apex à la base (Photo 1). Les prélèvements, montés sur lame histologique dans de la glycérine, sont observés en microscopie optique (x 400). Les cellules ciliées externes (CCE) et internes (CCI) manquantes sont dénombrées sur des portions de 0,25 mm, ce qui permet de construire un cochléogramme qui donne le pourcentage de cellules détruites en fonction de la distance de l'apex, convertie en fréquence de réponse grâce au modèle de Greenwood (1990), adapté au cobaye (figure 21).

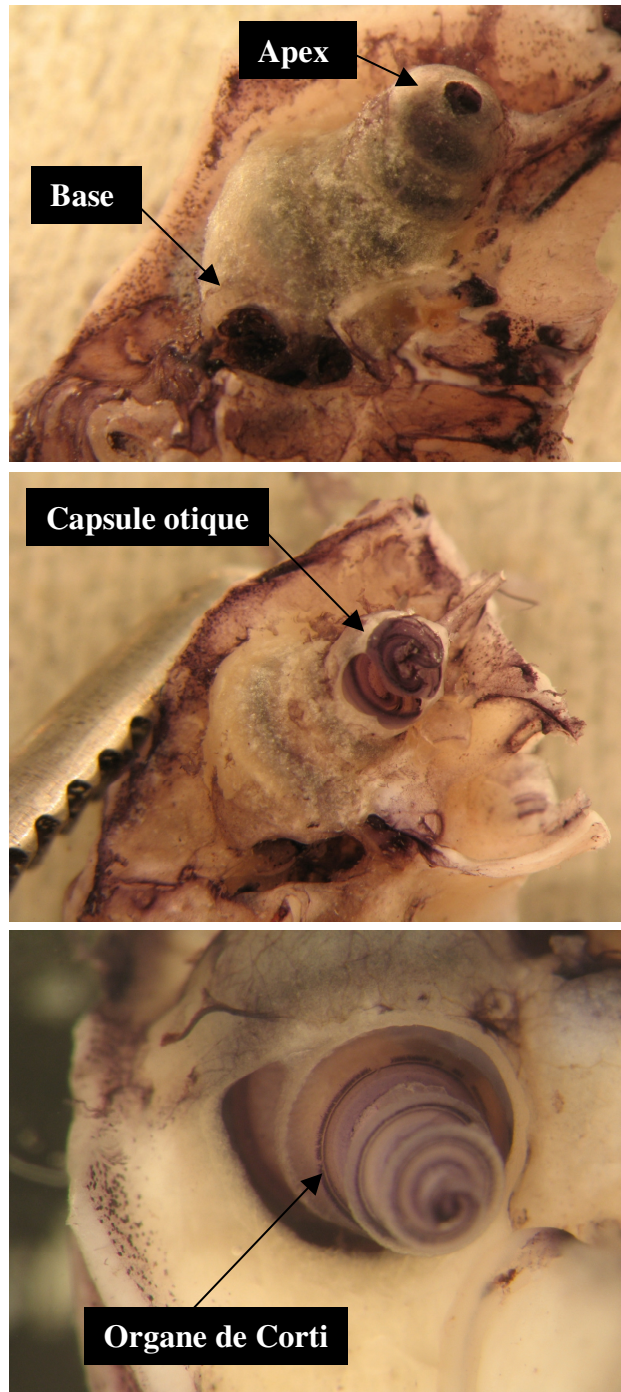


Photo 2 : Microdissection cochléaire : La capsule otique est ôtée de l'apex à la base de la cochlée. L'organe de Corti est alors prélevé par demi-tour cochléaire et placé sur lame d'histologie pour observation et comptage.

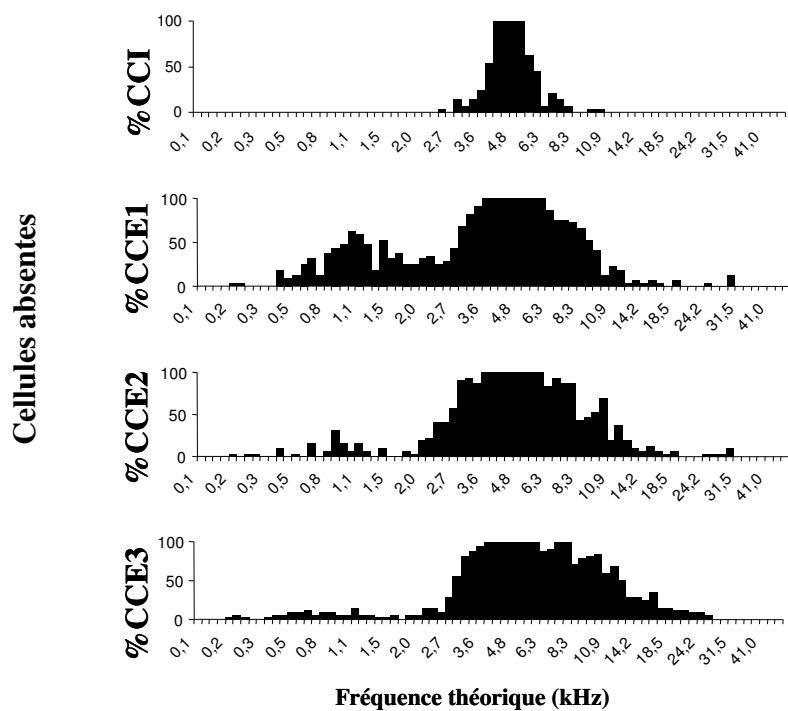
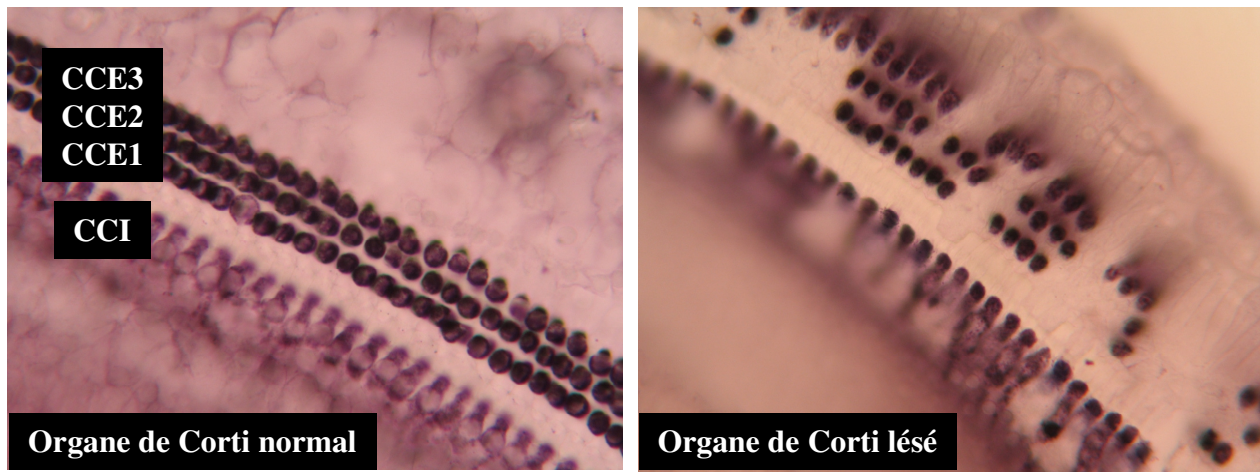


Figure 21 : Réalisation d'un cochléogramme : Les cellules ciliées internes (CCI) et les cellules ciliées externes (CCE1-3) sont dénombrées sur des portions de 0,25 mm. Le pourcentage de cellules absentes est reporté sur un graphique en fonction de leur position sur la cochlée, traduite en fréquence théorique de réponse selon l'abaque de Greenwood.

ANNEXE 2

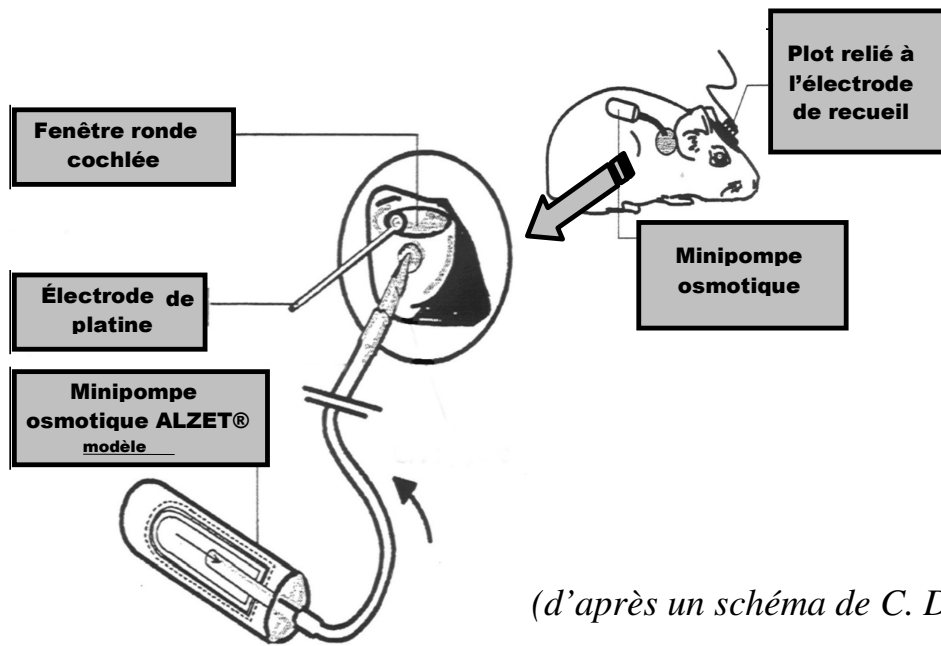
Matériel et méthodes de la 1^{ère} partie : Efficacité de l'administration intra-cochléaire de méthylprednisolone après traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye.

1. Etude préliminaire

Une étude préliminaire sur animal « sain » a été menée de façon à déterminer la concentration de MP utilisable sans effet sur l'audition. Plusieurs concentrations en MP ont été testées : 200, 300, 500 et 1000 μM , ainsi que la périlymphe artificielle seule. La méthylprednisolone, diluée dans la périlymphe artificielle (composition : 137 mM NaCl ; 5 mM KCl ; 2 mM CaCl₂ ; 1 mM MgCl₂ ; 10 mM Hepes ; 11 mM glucose ; pH ajusté à 7,4), est administrée en continu pendant 7 jours au moyen de la mini-pompe osmotique chez des cobayes non traumatisés. Les seuils auditifs sont mesurés avant traitement, puis 48 heures et 7 jours après.

2. Technique d'administration en continu

Les mini-pompes osmotiques (Alzet® pumps, Modèle 2001 ; volume 200 μl ; Durect Corp., Cupertino, CA, USA) sont reliées à un capillaire en silicone, terminé par un embout en verre. A l'extrémité de l'embout, une boule en silicone assure l'étanchéité du système en place (Figure 1). La mini-pompe est remplie avec le traitement voulu (PA \pm MP) de manière stérile. Lorsqu'elle est implantée en position sous-cutanée, la mini-pompe délivre son traitement en continu, avec un débit de 1 $\mu\text{l/h}$ pendant 7 jours.



(d'après un schéma de C. D'Aldin)

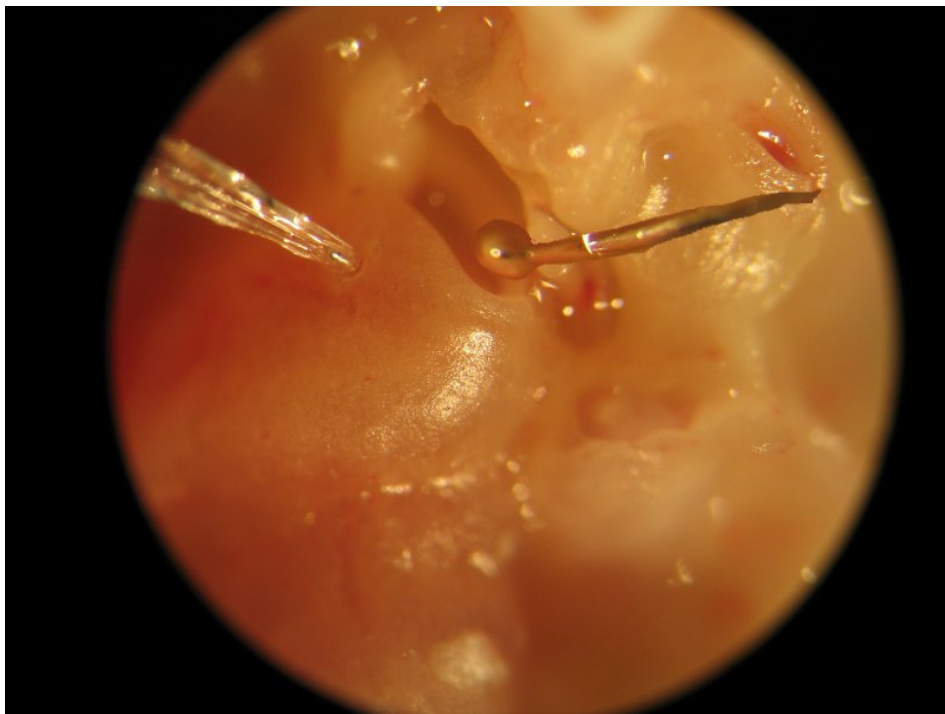


Figure 22 : Instrumentation chirurgicale des animaux: chaque cochlée est équipée d'une électrode d'enregistrement posée sur la fenêtre ronde; un micro-cathéter relié à une mini-pompe sous-cutanée déverse le traitement dans la rampe tympanique d'une des deux cochlées.

3. Procédures chirurgicales

La mise en place des électrodes et de la mini-pompe est réalisée stérilement, sous anesthésie générale : injection intra-péritonéale de tiletamine/zolazepam (Zoletil 100[®] - Virbac, 100 mg/kg) associée à une injection sous-cutanée de xylazine (Rompun 2 %[®] Bayer Pharma, 3mg/kg) puis 0,5 ml d'atropine 1 ‰. Ce protocole permet une anesthésie efficace de 2 heures sans réinjection. La température corporelle de l'animal est maintenue à 38 °C par un tapis chauffant durant toute l'anesthésie. Chaque bulle est abordée par voie rétro-auriculaire après injection locale d'Ubistesin[®] (articaïne adrénalinée) en trois points à la base de l'oreille. Une perforation à minima de la paroi osseuse permet le repérage de la cochlée sous microscope opératoire. Une électrode de platine est alors posée délicatement au contact de la fenêtre ronde. Sur l'une des cochlées, la paroi osseuse de la rampe tympanique, sous la fenêtre ronde, est perforée délicatement (0,3mm). L'extrémité du cathéter y est abouchée (figure 22). L'orifice de la bulle est obturé par une résine dentaire photo-polymérisable qui assure rapidement la fixation de l'électrode et du cathéter. Une électrode de référence est placée sous la peau, à proximité de la bulle. Les électrodes, après tunnellation sous-cutanée, sont connectées à un plot fixé par du ciment dentaire au sommet du crâne de l'animal. La mini-pompe osmotique est glissée sous la peau de l'animal, en position inter-scapulaire. Les animaux sont alors replacés en animalerie pendant 7 jours avant mise en expérimentation.

4. Suivi auditif et traitement

Les seuils auditifs sont mesurés pour chaque groupe d'animaux, avant traumatisme, 20 minutes après les tirs, puis après 24 heures, 2 jours, 7 jours et 14 jours de récupération. Ces mesures permettent le calcul des pertes auditives.

Afin que le traitement débute 1 heure après le traumatisme, la mini-pompe contenant de la périlymphe et implantée sept jours avant expérimentation, est échangée avec une nouvelle pompe, contenant la méthylprednisolone. Cet échange s'effectue un peu avant exposition au tir car il faut tenir compte du délai nécessaire pour que le nouveau traitement atteigne la cochlée.

5. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm esm. La significativité des différences entre les observations est évaluée par un test statistique non paramétrique (test U de Mann-Whitney), au moyen du logiciel *Statistica for windows* (Statsoft USA). L'hypothèse nulle est rejetée pour $p < 0,05$.

ANNEXE 3

Matériel et méthodes de la 2ème partie : Efficacité de l'administration à long terme de magnésium après traumatisme sonore par bruit d'arme chez le cobaye.

1. Mesure des pertes auditives

Les tests fonctionnels auditifs (potentiels évoqués et produits de distorsion) sont effectués avant traumatisme sonore, 20 minutes après traumatisme, puis après 7 jours, 14 jours, 1 mois et 3 mois de récupération.

Les seuils auditifs sont étudiés pour 12 fréquences (2 à 32 kHz) sous légère anesthésie (kétamine 40 mg/kg + xylazine 10 mg/kg), la température corporelle de l'animal étant maintenue à $38^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Des électrodes "aiguilles" (Grass E2-48, Astromed, Trappes) sont glissées en position sous-cutanée (l'électrode active sous l'oreille étudiée, l'électrode de référence au niveau du vertex et une électrode de mise à la masse au niveau du cou).

Le matériel utilisé pour générer les stimuli sonores et recueillir le potentiel d'action comprend 2 microprocesseurs et un atténuateur programmable (système 3 - Tucker-Davis Technologies TDT - Gainesville, FL, USA). Les stimuli sonores consistent en des bouffées de son pur (durée 13 ms, temps de montée 1,5 ms), présentées 15 fois par seconde. L'intensité sonore varie de 0 à 90 dB SPL par pas de 5 dB. La réponse cochléaire est amplifiée ($\times 100000$) par un amplificateur biologique différentiel (Grass RPS 107), filtrée (300 Hz - 3 kHz), moyennée sur 1024 échantillons et enregistrée sur PC. Le seuil auditif est considéré comme l'intensité sonore minimale pour laquelle il apparaît une réponse physiologique, bien distincte du bruit électrique, et correspondant au signal observé à plus forte intensité. Les pertes auditives au temps t sont calculées pour chaque animal, par la différence entre les seuils observés au temps t et ceux relevés avant tir.

Avant chaque test, le système est calibré grâce à un conditionneur Brüel and Kjaer (B&K - nexus, 140 kHz) relié à un microphone 1/2 pouce (B&K type 4191). Au cours de la calibration, chaque stimulus est enregistré sur un enregistreur numérique (Odyssey, OD100 Nicolet technologies), la fréquence et l'intensité sont analysées par un logiciel spécifique (*Proview* - Nicolet technologies).

2. Étude des produits de distorsion

Rappel du principe (Moulin et Collet 1996):

Les produits de distorsion acoustique correspondent à des sons réémis par la cochlée (oto-émissions) en réponse à deux sons purs continus, f_1 et f_2 , dont le rapport f_2/f_1 est défini (en général $f_2/f_1 = 1,1$ à $1,6$). La cochlée, système non linéaire, émet des produits d'intermodulation dont le plus ample est une composante algébrique $2f_1-f_2$ (figure 24). La cochlée est stimulée zone par zone par des couples de fréquence différente (f_1 et f_2) et répond ainsi avec une grande sélectivité fréquentielle. Cette réponse serait le reflet de l'activité des cellules ciliées externes. En pratique, on obtient par moyennage spectral, un Dpgramme, analogue à un audiogramme objectif.

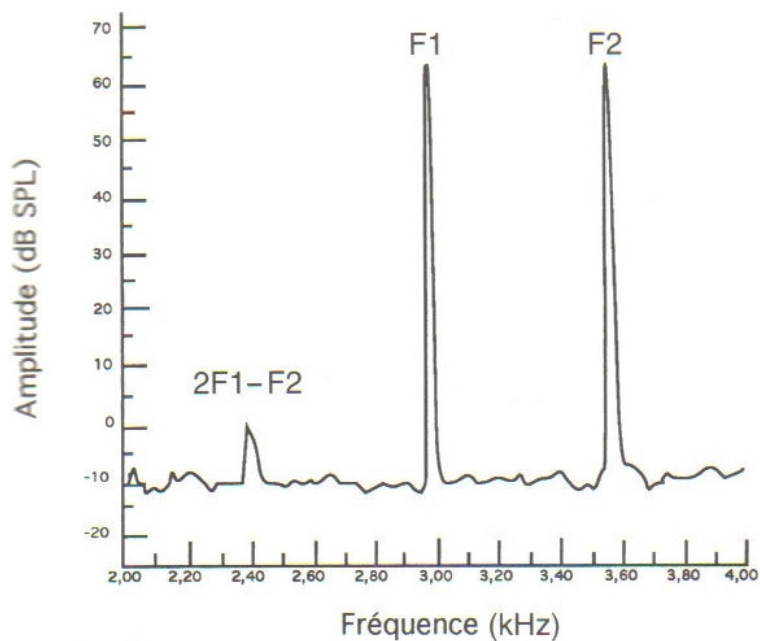


Figure 23 : Produits de distorsion acoustique (PDA) : F1 et F2 sont les sons stimulants, 2F1-F2 est le produit de distorsion émis par la cochlée.

Protocole utilisé :

L'équipement utilisé dérive de celui décrit par Mills et Rubel (1996) et permet l'étude des PDA sur les hautes fréquences (indispensable chez le rongeur). Le système a été mis au point grâce à une collaboration avec le Pr Paul Avan de la faculté de Clermont-Ferrand (Laboratoire de biophysique sensorielle). Il utilise le logiciel « Mdiapp » utilisé dans cette unité de recherche.

Les sons primaires sont générés par un microprocesseur programmable bi-voies (RP2.1 Tucker Davis Technologies TDT), et conditionnés par un amplificateur (ED1- TDT). Ils sont émis dans le canal auditif de l'animal (photo 3) au moyen de 2 haut-parleurs électrostatiques miniatures (EC1 – TDT). Le signal sonore émis par l'oreille est capté par un microphone miniature (système ER-10 B, etymotic Research), amplifié (MA3 – TDT) et analysé par le microprocesseur programmable RP2.1.

La mesure des produits de distorsion se réalise sous légère anesthésie, la température corporelle de l'animal étant maintenue à 38 °C par un tapis chauffant. Dans notre étude, les DPgrammes sont effectués avec les paramètres suivants :

- $f_2 = 2$ à 24 kHz (8 points par octave)
- $f_2/f_1 = 1,20$
- L1 (intensité de f_1) = 65 dB SPL
- L2 (intensité de f_2) = 60 dB SPL.

Les courbes d'entrée/sortie (I/O) sont établies pour 2 fréquences (8 et 16 kHz), pour une intensité variant de 20 à 75 dB SPL par pas de 2 dB.

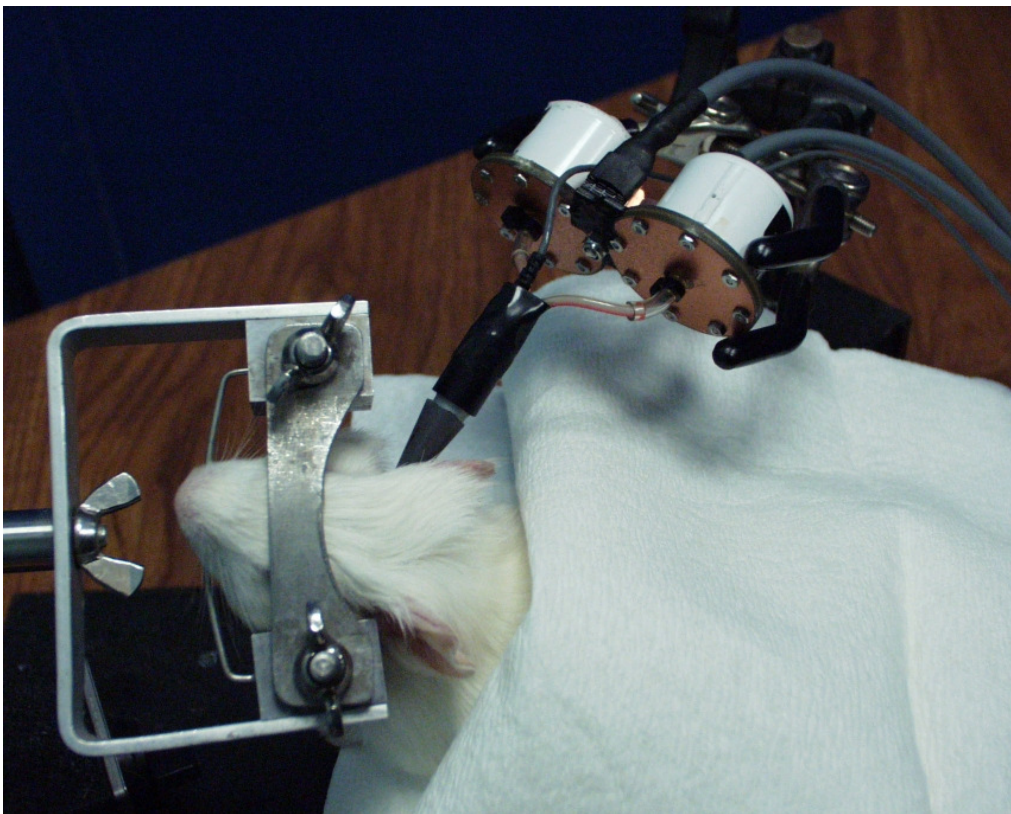


Photo 3 : Mesure des produits de distorsion chez l'animal anesthésié.

3. Analyse histologique de la cochlée

L'étude histologique des cochlées se fait comme décrit dans l'ANNEXE 1.

4. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm esm. La significativité des différences entre les observations est évaluée par une analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test post-hoc Fischer LSD, au moyen du logiciel *Statistica for windows* (Statsoft USA). L'hypothèse nulle est rejetée pour $p < 0,05$.

ANNEXE 4

Matériel et méthodes de la 3^{ème} partie (A) : Etude préliminaire : cinétique comparative de l'apoptose après traumatisme sonore par bruit continu versus bruit d'arme.

1. Traumatisme sonore

Avant l'exposition, chaque animal a été anesthésié par une injection intra-péritonéale de kétamine chlorydrate (Imalgène[®], 40 mg/kg) avec de la médétomidine hydrochloride (Domitor[®], 10 mg/kg).

Traumatisme sonore par bruit d'arme :

L'exposition sonore est réalisée de la même manière que pour les études précédentes (voir ANNEXE 1).

Traumatisme sonore par bruit continu :

Les animaux anesthésiés ont été exposés à un son continu à la fréquence de 4 kHz, d'une intensité de 137 dB SPL pendant 45 minutes (photo 4). Le son a été généré à l'aide d'un générateur de signal (HP35670A) connecté à un amplificateur (Crown, type XLS202) et diffusé par un moteur acoustique (JBL type 2450H). Les expositions ont été réalisées en chambre anéchoïque. Un sonomètre (Modèle 2238, Brüel & Kjaer) placé parallèlement à l'oreille de l'animal a permis une estimation de l'intensité du son perçu. Après l'exposition, les animaux ont reçu une injection intra-péritonéale d'atipamezole hydrochloride (10 mg/kg, Antisedan[®]) afin de faciliter leur réveil.



Photo 4 : Le traumatisme sonore par bruit continu est réalisé en chambre anéchoïque.

2. Etude préliminaire : évaluation des pertes auditives et des pertes cellulaires totales

Les seuils auditifs ont été mesurés 20 min et 14 jours après l'exposition sonore par la technique de l'électrocochléographie comme décrite dans les études précédentes (ANNEXE 1). L'analyse histologique a été réalisée de la même manière que pour les études précédentes (ANNEXE 1).

3. Marquage de l'apoptose des cellules ciliées par la technique de TUNEL

La technique de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling) est utilisée pour marquer les fragments d'ADN des cellules apoptotiques (Heathwole, 1999). Les animaux ont été sacrifiés à des temps définis après l'exposition sonore (1 heure, 3 heures, 24 heures, 48 heures, 7 jours et 14 jours) : après une anesthésie profonde par injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (Dolethal[®], 500mg/ kg), les cochlées ont été prélevées. Elles ont ensuite été fixées avec du paraformaldéhyde à 4 % et les organes de Corti ont été microdisséqués. Le kit «In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein » a été utilisé pour mesurer l'apoptose (Roche Diagnostics, Meylan, France). Ce kit permet de marquer les fragments D'ADN caractéristiques de la mort cellulaire par apoptose. Le taux de fragments d'ADN dans les cellules apoptotiques est si élevé que le degré de marquage des cellules de ce test est un bon discriminateur entre l'apoptose et la nécrose. Les organes de Corti ont été incubés une nuit dans de l'éthanol froid à 70%. Les membranes ont été perméabilisées par la protéinase K (20 µg/ml) à température ambiante pendant 5 minutes. Les tissus sont ensuite incubés dans une solution fraîchement préparée contenant l'enzyme TdT (terminal transférase) et des nucléotides couplés à la fluorescéine (Fluorescein-dUTP) pendant 2 heures à 37 °C. Les tissus sont ensuite contre-marqués avec de l'iodure de propidium (IP, 5µg/ml) à température ambiante pendant 10 minutes. Après un rinçage dans une solution de PBS, les organes de Corti sont montés entre lame et lamelle dans une solution contenant de l'Antifade (Slowfade Antifade Kit, Molecular Probes, Oregon, USA). Les nucléotides marqués sont visualisés à l'aide d'un microscope à fluorescence.

4. Quantification des cellules apoptotiques

Les cellules TUNEL positives (fluorescentes dans le vert) ont été comptées sous microscope à fluorescence dans des portions de 0,25 mm, ce qui a permis de réaliser un cochléogramme qui montre le pourcentage de cellules ciliées apoptotiques en fonction de la distance à partir de l'apex. Celle-ci a ensuite été convertie en fréquence de réponse en utilisant le modèle de Greenwood adapté au cobaye (Greenwood, 1990).

5. Morphologie des cellules ciliées

5.1 Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission a été utilisée afin d'observer l'aspect intracellulaire des cellules ciliées endommagées. Comme décrit précédemment, les animaux ont été sacrifiés et les cochlées prélevées. Les cochlées ont été perfusées avec une solution d'acide osmique à 2% et les organes de Corti ont été microdisséqués. Les spécimens ont été immergés dans une solution de glutaraldéhyde à 2% et déshydratés dans des solutions de concentrations croissantes en éthanol. De fines sections (0,5 µm; 1 µm) et ultrafines (70nm) ont été préparées. Les tissus ont été observés au microscope électronique à transmission JEOL 1010 à 80 kV.

5.2 Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage a été utilisée afin d'observer les structures tridimensionnelle des cellules ciliées endommagées. Les animaux ont été sacrifiés à des temps

définis après l'exposition sonore à l'aide d'une injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (Dolethal[®], 500 mg/kg). Les cochlées ont été prélevées rapidement puis fixées dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 2 heures. Elles ont ensuite été post-fixées dans une solution d'acide osmique à 2% pendant 2 heures. Les cochlées ont été déshydratées dans des solutions de concentrations croissantes en éthanol. Les organes de Corti ont été alors microdisséqués. Après la microdissection, la déshydratation a été complétée par une projection de CO₂ à son point critique (machine Polaron). Les spécimens sont fixés à l'aide d'un adhésif en argent puis enveloppé d'un mélange or-palladium. L'observation des tissus a été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à balayage FEI quanta 2000.

ANNEXE 5

Matériels et méthodes de la 3^{ème} partie (B) : efficacité de l'administration intra-cochléaire de deux molécules anti-apoptotiques: leupeptine et z-VAD-FMK.

1. Etude préliminaire : substances thérapeutiques testées

Une solution de périlymphe artificielle (137 mM NaCl ; 5 mM KCl ; 2 mM CaCl₂ ; 1mM MgCl₂ ; 10 mM Hepes ; 11mM glucose ; pH ajusté à 7.4) a été testée seule et en absence de traumatisme sonore sur la fonction auditive afin de valider le protocole chirurgical.

Plusieurs concentrations de leupeptine (1mg/ml et 500 µg/ml) (Fluka, Sigma, Saint-Louis, USA) et de z-VAD-FMK (250, 100 et 50 µM) (Sigma, Saint-Louis, USA) ont été testées en absence de traumatisme sonore sur la fonction auditive afin de déterminer une concentration non ototoxique. Ces deux substances ont été diluées dans la périlymphe artificielle et administrées pendant 7 jours à l'aide d'une micro-pompe osmotique. Les seuils auditifs ont été mesurés par la technique des potentiels évoqués auditifs (PEA) avant et 48 heures, 7 jours et 14 jours après l'exposition sonore.

2. Administration des substances

Des micro-pompes osmotiques (pompes Alzet ; Modèle 2001 ; volume 200 µl ; Durect Corp. ; Cupertino, USA) connectées à un cathéter ont été utilisées pour administrer les substances directement dans la cochlée. Les micro-pompes ont été remplies soit avec la périlymphe artificielle soit avec les solutions de leupeptine ou Z-VAD-FMK dans des conditions stériles. Un capillaire de verre connecté au cathéter termine l'ensemble du système. A l'extrémité, une boule en silicone assure une étanchéité entre le capillaire et la cochlée. Lorsqu'elle est implantée en position sous-cutanée, la micro-pompe délivre son traitement en continu avec un

débit de 1 μ l/h pendant 7 jours. La veille de l'implantation, la micro-pompe a été incubée dans une solution de NaCl à 37°C pendant la nuit afin que la diffusion intra-cochléaire débute et continue immédiatement après l'implantation.

3. Traumatisme sonore et procédure chirurgicale

Avant l'exposition, chaque animal a été anesthésié par une injection intra-péritonéale de tiletamine/zolazepam (ZOLETIL[®] 100, Virbac ; 100mg/kg) combinée à de la xylazine (Rompun[®] 2%, Bayer Pharma ; 3mg/kg). Cette méthode permet une anesthésie d'environ 2 heures, ce qui permet de réaliser l'implantation chirurgicale de la micro-pompe immédiatement après l'exposition sonore.

Chaque animal a été exposé à 3 tirs à blanc de FAMAS dans une chambre anéchoïque. L'animal est placé à 60 cm du canon, ce qui correspond à une intensité de 170 dB SPL (valeur crête). Immédiatement après le tir, l'animal est préparé pour l'implantation de la micro-pompe. La température a été maintenue à 38 °C à l'aide d'un tapis chauffant. Une des cochlées a été exposée (ouverture de la bulle tympanique). Une perforation de 0,15 mm a été réalisée près de la fenêtre ronde à la base de la cochlée. L'extrémité de la micro-pompe (cathéter + capillaire de verre) préalablement remplie a été apposée délicatement au niveau de la perforation. Du ciment dentaire photo-polymérisant a été utilisé afin de refermer la bulle tympanique. La micro-pompe osmotique a été jointe au cathéter et insérée sous la peau de l'animal.

4. Mesure des seuils auditifs

Les seuils auditifs sont mesurés avec la même technique décrite dans l'ANNEXE 3. Il s'agit de la technique des potentiels évoqués auditifs (PEA). L'animal est légèrement anesthésié

(Kétamine 40mg/kg et médétomidine hydrochloride 10mg/kg). La température de l'animal est maintenue à 38 °C à l'aide d'un tapis chauffant. Les seuils auditifs ont été mesurés pour 6 fréquences : 2, 4, 8, 16, 19 et 22 kHz, 2 jours avant l'exposition sonore (seuils témoins) puis 2 jours, 7 jours et 14 jours après.

5. Analyse histologique de la cochlée

A l'issue de l'expérimentation (14 jours), les animaux sont sacrifiés, les cochlées sont prélevées et un comptage des pertes cellulaires est réalisé comme décrit dans l'ANNEXE 1.

6. Méthode statistique

Les résultats ont été comparés entre les oreilles traitées (implantées) et les oreilles non traitées (non implantées). La significativité des différences entre les seuils auditifs moyens a été évaluée par une analyse de variance (ANOVA) suivi d'un test post-hoc Fischer LSD. Le même test a été utilisé pour les comparaisons de pertes cellulaires. Le logiciel *Statistica for windows* (Statsoft, Tulsa, Okla, USA) a été utilisé pour la réalisation de ces tests. L'hypothèse nulle a été rejetée pour $p < 0.05$.

Résumé

Ce travail de recherche regroupe plusieurs études portant sur de nouvelles stratégies thérapeutiques après traumatisme sonore par bruit impulsif (arme) chez le cobaye. Il a pour objectif d'évaluer différents protocoles thérapeutiques (traitement, voie d'administration et durée). La première étude s'intéresse au traitement commun actuellement utilisé chez l'Homme: l'administration de corticoïdes. Ceux-ci sont connus pour passer difficilement la barrière hémato-cochléaire. Le but de l'étude est d'évaluer leur administration intra-cochléaire directe. La méthylprednisolone, administrée en continu durant 7 jours, après un traumatisme sonore par bruit d'arme, accélère la récupération et préserve en partie la survie des cellules ciliées auditives. La seconde étude porte sur l'efficacité du magnésium à long terme (1 mois) administré par voie systémique. Le magnésium durant un mois est le traitement le plus efficace en termes de préservation des cellules ciliées. La dernière étude s'intéresse à la mort des cellules ciliées consécutive au traumatisme sonore. La mort cellulaire apparaît dans les 24 premières heures après l'exposition au bruit (bruit d'arme/bruit continu). Suite à ce résultat, deux traitements utilisant des anti-apoptiques (leupeptine et z-VAD-FMK) ont été testés par voie intra-cochléaire directe 1 heure après le traumatisme et leur diffusion a duré 7 jours. L'efficacité du traitement a été évaluée sur la fonctionnalité des cellules auditives (audiogrammes) et sur la survie de ces cellules en fin d'expérimentation (histologie, comptage des cellules apoptotiques). L'administration intra-cochléaire de z-VAD-FMK de façon continue pendant 7 jours après un traumatisme sonore par bruit d'arme accélère la récupération auditive et permet la survie des cellules ciliées. A contrario, la leupeptine n'a pas été efficace dans notre modèle. Ces résultats suggèrent qu'une des premières étapes dans la physiopathologie du traumatisme sonore par bruit d'arme implique la mort des cellules ciliées par la voie des caspases plutôt que par la voie des calpains. Les inhibiteurs de caspases sont donc de bons candidats thérapeutiques pour limiter les pertes cellulaires consécutives au bruit d'arme. Les résultats de ce travail de thèse permettent de mieux comprendre la physiopathologie auditive après traumatisme sonore par bruit d'arme et d'évaluer les différentes fenêtres thérapeutiques afin de tirer la meilleure stratégie utilisable chez l'Homme.

Mots-clés: bruit d'arme, immuno-histologie des cellules ciliées, administration intra-cochléaire, anti-apoptiques.

Summary

This research work regroups several studies about new therapeutic strategies following impulsional noise (gunshot) acoustic trauma on guinea pigs. The aim is the evaluation of different treatment methods (administration route and kinetic) after a gunshot noise acoustic trauma. The first study is about the usual treatment based on corticoids administration in humans. Corticoids are known to cross with difficulty the hematocochlear barrier. The goal of this work is to evaluate an intra-cochlear perfusion for the treatment. The direct perfusion of methylprednisolone continuously during 7 days, following a gunshot noise acoustic trauma, accelerates the hearing recovery and preserves most of the hair cells from the death. The second study concerns magnesium supplementation as treatment by the systemic route and particularly focuses on a long-term administration (1 month). The long-term administration of magnesium was the most effective treatment in terms of hair cell preservation. Hair cells death caused by gunshot noise is the subject of the last study. Hair cells death appears during the first 24 hours following the noise exposure (gunshot noise/continuous noise). With these results, two anti-apoptotic treatments (leupeptin and z-VAD-FMK) were tested. 1 hour following the gunshot noise exposure, the direct intra-cochlear route was used during 7 days continuously. The effectiveness of the treatment was assessed on auditory function (audiograms) and on hair cells survival (histology, died cells counting). The intra-cochlear administration of z-VAD-FMK continuously during 7 days following gunshot noise trauma accelerates hearing recovery and preserves hair cells from death. However, leupeptin was not effective in this model of trauma. These results suggest that one of the early steps in gunshot noise-induced trauma may involve the caspase rather than the calpain pathway. Caspase inhibitors are, therefore, potential candidates for new therapy in order to limit gunshot noise-induced hair loss. The present study confirms the importance of a fast and early administration of pharmacological agent after a traumatic noise over-exposure. These results give us a better understanding on the auditory physiopathology following a gunshot noise acoustic trauma and led us to evaluate a therapeutic windows for humans treatment.

Key-words: gunshot noise, hair cells immunohistology, intra-cochlear administration, anti-apoptotics.