



HAL
open science

Diabète et audition : décryptage des conséquences fonctionnelles et histologiques sur modèles murins

Guillaume Sabourin

► **To cite this version:**

Guillaume Sabourin. Diabète et audition : décryptage des conséquences fonctionnelles et histologiques sur modèles murins. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Clermont Auvergne, 2024. Français. NNT : 2024UCFA0009 . tel-04739225

HAL Id: tel-04739225

<https://theses.hal.science/tel-04739225v1>

Submitted on 16 Oct 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne
pour l'obtention du grade de Docteur d'Université (Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Neurosciences

soutenue le 19 janvier 2024

Guillaume Sabourin

Diabète et Audition : Décryptage des conséquences fonctionnelles et histologiques sur modèles murins

Président du jury :	Pr. Laurent MOREL (UCA, Clermont-Ferrand)
Membres du jury :	Dr. Raphaëlle CASSEL (INSERM 1118, Strasbourg) Dr. Sedigheh DELMAGHANI (Institut Pasteur, Paris)
Rapporteurs :	Dr. Steeve BOURANE (UMR DÉTROI, La Réunion) Pr. Naima DEGGOUJ (UCLouvain, Belgique) Dr. Benjamin DELPRAT (MMDN, Montpellier)
Directeur de thèse :	Pr. Denis ARDID (UCA, Clermont-Ferrand)
Co-directeur de thèse :	Dr. Fabrice GIRAUDET (UCA, Clermont-Ferrand)
Directeur du laboratoire :	Pr. Radhouane DALLEL (UCA, Clermont-Ferrand)

Remerciements

Aux membres du jury,

A Monsieur le **Professeur Denis ARDID**, merci d'avoir accepté de m'encadrer et de m'avoir accueilli au sein du laboratoire NeuroDol.

A Monsieur le **Docteur Fabrice GIRAUDET**, merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir encadré dans la réalisation de ce projet de thèse malgré les dernières difficultés rencontrées. Je te remercie également pour ta disponibilité, pour ton écoute et pour tes conseils techniques et théoriques précieux.

A Monsieur le **Docteur Steve BOURANE**, merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail et d'être rapporteur de ma thèse.

A Madame la **Professeure Naima DEGGOUJ**, merci d'avoir acceptée d'évaluer mon travail et d'être rapportrice de ma thèse.

A Monsieur le **Docteur Benjamin DELPRAT**, merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail et d'être rapporteur de ma thèse.

A Madame le **Docteur Raphaëlle CASSEL**, merci d'avoir acceptée d'être membre du jury de ma thèse.

A Madame le Docteur **Sedigheh DELMAGHANI**, je vous remercie d'avoir acceptée de faire partie des membres du jury.

A Monsieur le **Professeur Jean Marc EDELIN** et à Monsieur le **Professeur Igor TAUVERON**, merci d'avoir accepté de juger et critiquer mes travaux de thèse en tant que membres de mes comités de thèse.

Aux financeurs,

Je remercie le groupe **ENTENDRE** d'avoir accepté de financer mes 3 années de thèses.

A l'équipe du laboratoire de biophysique neurosensorielle,

A Monsieur le **Professeur Paul AVAN**, merci de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire et de m'avoir fait partager vos connaissances et votre expérience.

A Madame **Laurence CHAUVET**, un grand merci pour ton soutien à toute épreuve, pour ton aide logistique et administrative, et pour toutes nos discussions animées durant ces 4 années passées au laboratoire. Allez l'OM !

A **Thamara, Ludivine et Pierrick**, merci pour votre soutien tout au long de cette thèse et de tous ces bons moments passés avec vous, d'avoir partagé ce fameux weekend à la neige post-Covid.

A **Marine**, je ne pourrai jamais assez te remercier pour tous les moments passés avec toi, bons ou moins bons, et d'avoir toujours été là même dans les moments les plus compliqués durant ces 2 années passées à tes côtés. Tu as été un roc. Mille mercis et je te donne force et courage pour la suite de ta thèse.

A mes **parents**, à mes **grands-parents**, merci pour votre soutien sans faille pour tous les choix que j'ai pu faire et votre dévouement de chaque instant.

A mes **sœurs Aurore et Angélique**, merci d'avoir été toujours présentes et de m'avoir soutenu à chaque instant, de m'avoir donné le courage d'accomplir cette thèse.

A toute ma famille, merci d'être là pour moi depuis toujours.

A mes amis du **Doct'Auvergne** : **Pauline, Jeanne, Clément, Seb, Léa, Coline, Guerric, Fred et tous les membres que je ne peux pas tous vous citer**. Un immense merci pour tous les moments de décompression, de rigolade, de soutien. Sans vous, je ne serais pas allé très loin..

Table des matières

Partie 1 : Le diabète.....	12
1. Introduction.....	12
1.1 Chez l'humain	12
1.1.1. Définition	12
1.1.2. Type 2	13
1.1.2.1. Définition.....	13
1.1.2.2. Pathogénèse.....	13
1.1.2.3. Facteurs de risque	14
1.1.2.4. Traitement.....	15
1.1.3. Type 1	15
1.1.3.1 Définition	15
1.1.3.2 Pathogénèse	16
1.1.3.1. Facteurs de risque	16
1.1.3.2. Traitement.....	17
1.1.4. Un troisième type de diabète : le diabète gestationnel.....	18
1.1.5. Complications liées au diabète connues	18
1.1.5.1. Macroangiopathies.....	19
1.1.5.2. Microangiopathies connues	20
1.1.5.2.1. Neuropathies.....	20
1.1.5.2.2. Néphropathies.....	22
1.1.5.2.3. Rétinopathies	22
1.2. Chez l'animal	23
1.2.1. Modèle diabétique	23
1.2.1.1. Modèles de Diabète de type 2	24
1.2.1.2. Modèles de Diabète de type 1	25
1.2.1.2.1. Modèle spontané auto-immun	25
1.2.1.2.2. Modèle induit génétiquement	26
1.2.1.2.3. Modèle induit chimiquement.....	26
1.2.1.2.4. Autres modèles	28
1.2.1.2.5. Modèle neuropathique diabétique	28
Etude n°1 - Induction d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur des modèles murins.....	30
I) Preuve de concept.....	30
II) Méthodes : Protocole expérimental d'induction	31
III) Protocole n°1 : Syndrome métabolique hyperglycémique sur la souche de souris C57Bl/6JrJ	
32	

A)	Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 150 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ	33
B)	Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ	37
C)	Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 125 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ	40
IV)	Protocole n°2 : Syndrome métabolique hyperglycémique sur la souche de souris C57Bl/6NrJ	44
A)	Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 150 mg/kg sur des souris C57Bl/6NrJ	45
B)	Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris C57Bl/6NrJ	49
V)	Protocole n°3 : Syndrome métabolique hyperglycémique sur la souche de souris CBA/JrJ.....	52
A)	Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 150 mg/kg sur des souris CBA/JrJ..	53
B)	Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris CBA/JrJ..	57
C)	Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 125 mg/kg sur des souris CBA/JrJ..	60
	Discussion – Partie 1 Diabète	64
I)	Avant-propos	64
A)	Pourquoi le choix du terme « syndrome métabolique hyperglycémique » (SMH) à la place de « diabète ».....	64
B)	Pourquoi le choix du modèle murin	65
C)	Choix d'animaux « jeunes ».....	66
D)	Choix de la STZ.....	67
II)	Discussion étude 1 Induction d'un SMH.....	68
a)	Hyperglycémie liée à l'injection de STZ.....	68
b)	Perte de poids corporel liée à l'injection de STZ.....	70
c)	Perte de la conduction nerveuse caudale liée au statut diabétique.....	71
d)	Autres paramètres de caractérisation du SMH non étudiés.....	74
a)	Marqueurs sanguins	74
b)	Troubles comportementaux.....	75
i.	Allodynie.....	75
ii.	Hyperalgésie	76
iii.	Trouble moteur	76
e)	Conclusion	77
f)	Réflexions éthiques et le bien-être animal des animaux recevant de la STZ.....	79
g)	Perspectives – Etude 1	82
a)	Hyperglycémie à bas bruit – type 2.....	82
b)	Type 2 chez les jeunes.....	82

c) Utilisation d'autres techniques pour confirmer l'hypothèse	82
Partie 2 : L'audition : nouvelle complication du diabète	84
2. Introduction.....	84
2.1. Chez l'humain.....	84
2.1.1. Audition : généralités	84
2.1.1.1. Anatomie/Physiologie cochléaire.....	84
2.1.1.2. Physiologie et Atteinte vasculaire	86
2.1.1.3. Physiologie et Neuropathie auditive	87
2.1.2. Pathologies syndromiques associant diabète et perte de l'audition	90
2.1.2.1. Ataxie de Friedreich.....	91
2.1.2.2. Syndrome de Wolfram	92
2.1.2.3. Syndrome d'Alström.....	93
2.1.1.4. Maladie d'Alzheimer (ou diabète de « type 3 »).....	93
2.2. Chez l'animal	94
2.2.1. Quel lien avec l'audition ?	94
2.2.2. Etudes précliniques sur les pathologies associant diabète et perte auditive	94
2.2.2.3. Atteinte auditive d'origine vasculaire (strie vasculaire, CCE).....	95
2.2.2.4. Atteinte neurale (CCI, fibres nerveuses, voie centrale).....	96
3. Objectif de la thèse.....	98
3.1. Contexte de mon travail.....	98
Etude n°2 de l'impact d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la fonction auditive périphérique sur des modèles murins	100
I) Protocole n°1.....	100
Etude de l'impact d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la fonction auditive périphérique chez des souris de souche C57Bl/6JrJ	100
A) Etude des Produits de distorsion acoustique.....	102
Seuils auditifs acoustiques	102
B) Etudes des Potentiels évoqués auditifs précoces	104
a) Seuils auditifs électrophysiologiques	104
b) Comparaison seuils auditifs acoustiques et électrophysiologiques.....	106
c) Latences des ondes I, II et V	108
C) Analyse histologique de cochlée	114
II) Protocole n°2.....	117
Etude de l'impact d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la fonction auditive périphérique chez des souris de souche CBA/JrJ	117
A) Etude des Produits de distorsion acoustiques	119
Seuils auditifs acoustiques	119

B) Etudes des Potentiels évoqués auditifs précoces	121
a) Seuils auditifs électrophysiologiques	121
b) Comparaison seuils auditifs acoustiques et électrophysiologiques.....	123
c) Latences des ondes I, II et V	124
C) Analyse histologique de cochlée	130
Etude n°3 - l'impact d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la fonction auditive centrale sur des modèles murins	133
Protocole n°1.....	134
Etude de l'impact d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la fonction auditive centrale chez des souris de souche C57Bl/6JrJ	134
Protocole n°2.....	136
Etude de l'impact d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la fonction auditive centrale chez des souris de souche CBA/JrJ	136
Discussion Partie 2.....	138
Etudes 2 et 3 Etude de l'impact d'un SMH sur la fonction auditive.....	138
I) Souche C57Bl/6JrJ	138
A) Atteinte vasculaire.....	138
B) Atteinte neurale	139
III) Souche CBA/JrJ	141
Conclusion générale	169
Bibliographie.....	171

Table des figures

FIGURE 1 : DEFINITIONS DE DIABETES DE TYPE 1 ET 2. CREATED WITH BIORENDER.COM	17
FIGURE 2 : SCHEMA DES DIFFERENTES COMPLICATIONS DIABETIQUES COMMUNES. CREATED WITH BIORENDER.COM.....	19
FIGURE 3 : PATHOGENESE DE LA NEUROPATHIE DIABETIQUE. D'APRES FELDMAN ET AL., 2019. CREATED WITH BIORENDER.COM	21
FIGURE 4 : EVALUATION DE L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 150 MG/KG SUR DES SOURIS C57BL/6JRJ.....	35
FIGURE 5 : EVALUATION DE L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS C57BL/6JRJ.....	39
FIGURE 6 : EVALUATION DE L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 125 MG/KG SUR DES SOURIS C57BL/6JRJ.....	42
FIGURE 7 : EVALUATION DE L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 150 MG/KG SUR DES SOURIS C57BL/6NRJ.....	47
FIGURE 8 : EVALUATION DE L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS C57BL/6NRJ.....	50
FIGURE 9 EVALUATION DE L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 150 MG/KG SUR DES SOURIS CBA/JRJ.	55
FIGURE 10 : EVALUATION DE L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS CBA/JRJ.....	59
FIGURE 11 : EVALUATION DE L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 125 MG/KG SUR DES SOURIS CBA/JRJ.....	61
FIGURE 12 : REPRESENTATION DU SCORE DE L'EVALUATION DE L'ETAT CORPOREL SUR LA DUREE DES EXPERIMENTATIONS POUR LES SOUCHES C57BL/6JRJ (A) ET CBA/JRJ (B)	81
FIGURE 13 : SCHEMA D'UNE COCHLEE. D'APRES SAROUL ET AL., 2015. CREATED WITH BIORENDER.COM.....	85
FIGURE 14 : COUPE CORONAIRE SCHEMATIQUE D'UNE COCHLEE REPRESENTANT LES DIFFERENTES STRUCTURES DE L'ORGANE DE CORTI. D'APRES WONG ET RYAN, 2015.....	85
FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'INNERVATION AFFERENTE DES CELLULES CILIEES. D'APRES KUJAWA ET LIBERMAN, 2015	88
FIGURE 16 : EVALUATION DE L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS C57BL/6JRJ.....	101
FIGURE 17 : EVALUATION DE L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS C57BL/6JRJ SUR LES PRODUITS DE DISTORSION ACOUSTIQUES.	103
FIGURE 18 : EVALUATION DE L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS C57BL/6JRJ SUR LES POTENTIELS EVOQUES AUDITIFS PRECOCES.....	105
FIGURE 19 : EVALUATION DE L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS C57BL/6JRJ SUR LES POTENTIELS EVOQUES AUDITIFS PRECOCES ET LES PRODUITS DE DISTORSION ACOUSTIQUES	107
FIGURE 20 : EVALUATION DE LA LATENCE DE L'ONDE I SUITE A L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS C57BL/6JRJ.....	109
FIGURE 21 : EVALUATION DE LA LATENCE DE L'ONDE III SUITE A L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS C57BL/6JRJ.....	111
FIGURE 22 : EVALUATION DE LA LATENCE DE L'ONDE V SUITE A L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS C57BL/6JRJ.....	113
FIGURE 23 : COUPE HISTOLOGIQUE D'ORGANE DE CORTI SUITE A L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS C57BL/6JRJ.....	114
FIGURE 24 : DETERMINATION DE LA DENSITE DES GANGLIONS SPIRAUX SUITE A L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS C57BL/6JRJ.....	115

FIGURE 25 : EVALUATION DE L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS CBA/JrJ.....	118
FIGURE 26 : EVALUATION DE L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS CBA/JrJ SUR LES PRODUITS DE DISTORSION ACOUSTIQUES.....	120
FIGURE 27 : EVALUATION DE L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS CBA/JrJ SUR LES POTENTIELS EVOQUES AUDITIFS PRECOCES.....	122
FIGURE 28 : EVALUATION DE L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS C57BL/6JrJ SUR LES POTENTIELS EVOQUES AUDITIFS PRECOCES ET LES PRODUITS DE DISTORSION ACOUSTIQUES.....	123
FIGURE 29 : EVALUATION DE LA LATENCE DE L'ONDE I SUITE A L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS CBA/JrJ.....	125
FIGURE 30 : EVALUATION DE LA LATENCE DE L'ONDE III SUITE A L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS CBA/JrJ.....	127
FIGURE 31 : EVALUATION DE LA LATENCE DE L'ONDE V SUITE A L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS CBA/JrJ.....	129
FIGURE 32 : COUPE HISTOLOGIQUE D'ORGANE DE CORTI SUITE A L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS CBA/JrJ.....	130
FIGURE 33 : DETERMINATION DE LA DENSITE DES GANGLIONS SPIRAUX SUITE A L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS CBA/JrJ.....	131
FIGURE 34 : EVALUATION DE LA CONDUCTION CENTRALE AUDITIVE SUITE A L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS C57BL/6JrJ.....	135
FIGURE 35 : EVALUATION DE LA CONDUCTION CENTRALE AUDITIVE SUITE A L'ADMINISTRATION DE LA STZ A UNE DOSE DE 200 MG/KG SUR DES SOURIS CBA/JrJ.....	137
FIGURE 36 : DESCRIPTION DU SCORE DE L'ETAT CORPOREL OU BODY CONDITION SCORE (BCS) DES ANIMAUX. TRADUIT D'APRES ULLMAN-CULLERE ET FOLTZ, 1999.....	152
FIGURE 37 : REPRESENTATION DU TAUX DE SURVIE SUR LA DUREE DES EXPERIMENTATIONS POUR LES SOUCHES C57BL/6JrJ (A), C57BL/6NrJ (B) ET CBA/JrJ (C).....	154
FIGURE 38 : EXEMPLE D'UN ENREGISTREMENT DE VCN CHEZ UNE SOURIS CONTROLE CBA/JrJ (LOGICIEL D'ENREGISTREMENT ET D'ANALYSE EXAMINATION MANAGER). EN ABSCISSE, UNE DIVISION REPRESENTE 1 MILLISECONDES. EN ORDONNEE, CHAQUE DIVISION REPRESENTE 5 MICROVOLTS. DE HAUT EN BAS : ENREGISTREMENTS A UNE STIMULATION ELECTRIQUE DE 0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ET 1 MA. L'ONDE VISIBLE DES LA STIMULATION (0 MS) REPRESENTE UN ARTEFACT DE STIMULATION.....	156
FIGURE 39 : EXEMPLE DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL D'UN ENREGISTREMENT DE PRODUITS DE DISTORSION DES OTOEMISSIONS ACOUSTIQUES (ECHODIA, FRANCE).....	159
FIGURE 40 : EXEMPLE D'UN ENREGISTREMENT DE PDA A 16 KHz CHEZ UNE SOURIS CONTROLE C57BL/6JrJ (OTOPHYLAB, ECHODIA, FRANCE).....	160
FIGURE 41 : EXEMPLE DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL D'UN ENREGISTREMENT DE POTENTIELS EVOQUES AUDITIFS PRECOCES (ECHODIA, FRANCE).....	162
FIGURE 42 : EXEMPLE D'UN ENREGISTREMENT DE PEAP A UNE FREQUENCE DE STIMULATION DE 16 KHz ET D'INTENSITE DECROISSANTE DE 80 A 10 dB SPL A CHEZ UNE SOURIS CONTROLE CBA/JrJ (OTOPHYLAB, ECHODIA, FRANCE).....	162
FIGURE 43 : EXEMPLE D'UN ENREGISTREMENT DE PEALM A UNE INTENSITE DE 80 DBSPL CHEZ UNE SOURIS CONTROLE C57BL/6JrJ (LOGICIEL D'ENREGISTREMENT ET D'ANALYSE EXAMINATION MANAGER). EN ABSCISSE, UNE DIVISION REPRESENTE 5 MILLISECONDES.....	165

Liste des abréviations

ATP : adénosine triphosphate
BCS : body condition scoring
CCE : cellules ciliées externes
CCI : cellules ciliées internes
DIO : Diet Induced Obesity
EEG : électro-encéphalogramme
Gly : taux moyen de glycémie
GS : ganglions spiraux
IP : injection intrapéritonéale
Nnt : nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase
PC : poids corporel
PDA (ou DPOAE) : produits de distorsion acoustiques
PEA : potentiels évoqués auditifs
PEAlm : potentiels évoqués auditifs de latence moyenne
PEAp : potentiels évoqués auditifs précoces
ROS : espèces réactives à l'oxygène
SMH : syndrome métabolique hyperglycémique
STZ : streptozotocine
VCN : vitesse de conduction neurale
VGLUT3 : transporteur vésiculaire du glutamate

Partie 1 : Le diabète

1. Introduction

1.1 Chez l'humain

1.1.1. Définition

Le diabète est une maladie chronique métabolique systémique courante avec une prévalence mondiale croissante. Selon le rapport de la Fédération Internationale du Diabète, 537 millions de personnes sont atteintes du diabète dans le monde en 2021, soit environ 10,5% de la population. Ce nombre est prédit à s'élever à 643 millions (11,3%) en 2030 et jusqu'à 783 millions de personnes diabétiques (12,2% de la population mondiale) en 2045. Cette prévalence croissante fait du diabète l'une des urgences sanitaires actuelles. Il a été également estimé qu'environ 240 millions de personnes vivaient avec un diabète non diagnostiqué. Le diabète est la cause de 6,7 millions de décès dans le monde en 2021 (FID, 2021). Selon Santé publique France, 3,8 millions de personnes étaient traitées pour un diabète en France en 2022, soit une prévalence estimée à 5,6% de la population. Ce chiffre grimpera à 4,2 millions en 2045 représentant environ 6,5% de la population française.

Cette maladie est caractérisée par le défaut du pancréas à ne plus produire suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline que le pancréas produit. L'insuline est une hormone qui régule la concentration de sucre dans le sang ou glycémie. Cette hormone pancréatique a pour rôle de faciliter la pénétration du glucose dans les cellules notamment dans les cellules musculaires, les adipocytes (cellules graisseuses) et les hépatocytes (cellules du foie), ce qui en diminue la concentration dans le sang. L'absence de cette hormone empêche l'organisme de stocker du sucre. Dans le corps, la régulation de la glycémie est assurée grâce à un équilibre permanent entre différentes substances principalement hormonales. Pour une personne non diabétique, les valeurs d'une glycémie normale varient entre 60 mg de sucre/dL de sang et 110 mg/dL à jeun. Au-delà de cette valeur de 110 mg/dL, on parle d'hyperglycémie. L'hyperglycémie, ou concentration sanguine élevée de sucre, est une conséquence fréquente du diabète non contrôlé qui conduit au fil du temps à des atteintes graves de nombreux systèmes organiques. Ces complications semblent être induites par la détérioration et l'obstruction des petits vaisseaux sanguins et/ou la dégénérescence des nerfs classiquement appelée neuropathie (Van Niekerk et al., 2020).

Deux types majeurs de diabète existent : le diabète de type 1 et le diabète de type 2.

1.1.2. Type 2

1.1.2.1. Définition

Le diabète de type 2 précédemment appelé diabète sucré ou diabète non insulino-dépendant ou diabète de la maturité, représente la majorité des cas de diabète rencontrés dans le monde, environ 90% des cas de diabète (FID 2021). Les symptômes du diabète de type 2 sont discrets et il est le plus souvent diagnostiqué à l'occasion d'une prise de sang. Une glycémie à jeun anormalement élevée (supérieure à 110 mg/dL) est le symptôme le plus commun de cette maladie.

Le diabète de type 2 se caractérise par une hyperglycémie provoquée par une carence relative en insuline causée par un dysfonctionnement des cellules β pancréatiques (insulinopénie) ou par une résistance à l'insuline dans les cellules cibles en particulier celles du foie, du muscle et du tissu adipeux (insulinorésistance). Pour répondre à la demande accrue en insuline découlant de cette insensibilité, les cellules insulinosécrétrices du pancréas en produisent davantage jusqu'à s'épuiser. La production d'insuline devient alors insuffisante et le glucose s'accumule irrémédiablement dans le sang (Park et al., 2021).

Ces symptômes peuvent être les mêmes que ceux du diabète de type 1 mais sont souvent moins marqués. Ils apparaissent quand la maladie progresse se signalant par une augmentation de la soif et de la faim, une fatigue accrue, une cicatrisation lente ou encore le besoin fréquent d'uriner ainsi que d'autres complications associées. De ce fait, la maladie peut être diagnostiquée plusieurs années après son installation, une fois les complications déjà constatées (Chatterjee et al., 2017).

1.1.2.2. Pathogénèse

La résistance à l'insuline est principalement attribuée à l'obésité, causée par de mauvaises habitudes alimentaires et de mode de vie. La sensibilité à l'insuline fluctue en fonction de la consommation d'aliments riches en glucides, de l'activité physique et des signaux de stress. Pour les personnes obèses, une hyperglycémie peut aussi être associée à une altération du métabolisme du cholestérol. Un environnement riche en acides gras associé à des conditions d'hyperglycémie peut entraîner une réduction de l'expression du gène de l'insuline.

La production de produits de glycation avancée causée par l'hyperglycémie, ou l'accumulation de graisses sous forme d'acides gras, peuvent potentialiser la toxicité

inflammatoire en activant directement les voies inflammatoires. Ces voies inflammatoires vont induire des stress oxydatif, stress du réticulum endoplasmique et stress mitochondrial provoquant l'apoptose des cellules β pancréatiques. Dans l'ensemble, il est clair que l'inflammation est impliquée dans la pathogenèse du diabète de type 2 (Ramasubbu et Devi Rajeswari, 2023).

1.1.2.3. Facteurs de risque

Plusieurs facteurs peuvent être la cause de l'apparition d'un diabète de type 2. Ils ont été décrits comme étant d'origine génétique ou environnemental. La prédisposition génétique est généralement déterminée à la suite d'une exposition à un environnement obésogène caractérisé par un comportement sédentaire et une consommation excessive de sucre et de graisse dans la sphère familiale (Grarup et al., 2014).

L'incidence du diabète de type 2 augmente avec l'âge. La maladie se manifeste généralement après 40 ans et elle est diagnostiquée à un âge moyen proche de 65 ans. Cependant, le diabète de type 2 touche aussi de plus en plus de jeunes. Toutefois, les avancées en termes de santé (traitement et prévention) avec le vieillissement de la population et l'espérance de vie des diabétiques tendent à augmenter la prévalence de la maladie (Chatterjee et al., 2017 ; Wu et al., 2014). Le style de vie est un des facteurs les plus prédominants dans l'apparition d'un diabète de type 2. D'autres facteurs de risque existent mais sur lesquels il est possible d'agir comme le surpoids et l'obésité. Ils sont la conséquence d'une association entre une alimentation déséquilibrée riche en sucres et graisses et une sédentarité quotidienne. L'obésité augmente significativement le risque cardiovasculaire (Kolb et Martin, 2017).

Avec l'hyperglycémie, les diabétiques de type 2 peuvent également être atteints d'un syndrome métabolique associée telle que la dyslipidémie. Une dyslipidémie est une anomalie du taux de graisse dans le sang, elle se traduit soit par un taux élevé de triglycérides et de LDL cholestérol (« mauvais cholestérol ») soit par un faible taux de cholestérol HDL (« bon cholestérol »). Cette anomalie est très souvent associée au diabète de type 2 en partageant les mêmes facteurs de risque : obésité et sédentarité. Dans certains cas, tous ces facteurs vont accentuer des complications de type vasculaire et/ou neurale liées à l'installation du diabète de type 2 (Bahiru et al., 2021).

1.1.2.4. Traitement

Actuellement le patient diagnostiqué et pris en charge dispose de nombreuses propositions thérapeutiques plus souples d'utilisation. L'innovation pharmacologique est au cœur des progrès dans le traitement du diabète.

Les traitements pour lutter contre le diabète de type 2 existent mais le traitement le plus efficace est la modification des habitudes de vie en ayant une activité physique régulière et une alimentation équilibrée qui vont permettre une perte de poids nécessaire.

Le traitement via une prise en charge médicamenteuse du diabète de type 2 vise à rétablir l'équilibre de la glycémie selon différents mécanismes d'action. La metformine est l'antidiabétique le plus utilisé dans le traitement du diabète de type 2. Son rôle est de diminuer l'insulino-résistance des cellules utilisatrices du glucose (foie, muscle, tissu adipeux) tout en diminuant la néoglucogenèse hépatique. La metformine peut être utilisée seule ou associée à d'autres molécules comme les sulfamides hypoglycémiantes et les glinides qui stimulent la production d'insuline au niveau du pancréas (Foretz et al., 2014). D'autres solutions médicamenteuses existent comme les inhibiteurs des alpha-glucosidases intestinales qui ralentissent l'absorption des glucides alimentaires par l'intestin ou encore les glifozines (inhibiteurs d'un enzyme présent dans le rein : le SGLT2) qui réduisent la réabsorption rénale du glucose et favorisent ainsi son excrétion urinaire. Dans les cas les plus extrêmes, une insulinothérapie est préconisée si les traitements précédemment cités ne suffisent pas. Cette solution consiste à s'injecter de l'insuline, comme dans le diabète de type 1 (Tan et al., 2019).

1.1.3. *Type 1*

1.1.3.1 Définition

Le diabète de type 1 précédemment connu sous le nom de diabète insulino-dépendant ou juvénile, se manifeste généralement dans l'enfance / au début de l'âge adulte mais peut survenir à tout âge. Elle représente environ 10% de tous les cas diabétiques dans le monde avec une prévalence croissante et environ 9 millions de personnes diagnostiquées vivent avec ce diabète (FID 2021).

Les symptômes associés au diabète de type 1 sont les suivants : excrétion excessive d'urine (polyurie), sensation de soif (polydipsie), faim constante, perte de poids, altération de la vision et fatigue. Ces symptômes peuvent apparaître brutalement (DiMeglio et al., 2018). Certains cas peuvent également être atteints d'une acidocétose diabétique. Les corps cétoniques

sont des graisses stockées utilisées pour produire des substances énergétiques qui alimentent les organes en l'absence de glucose. Ils peuvent être contrôlé par un dosage avec un lecteur de cétonémie. L'acidocétose diabétique se traduit par une acidité excessive du sang du fait de l'augmentation de corps cétoniques qui est la conséquence d'une quantité insuffisante d'insuline dans le sang. Elle peut conduire in fine à un coma (Sassa et al., 2008).

1.1.3.2 Pathogénèse

Ce diabète est caractérisé par une production insuffisante d'insuline provoquant une hyperglycémie chronique sévère. La cause de diabète de type 1 n'est pas réellement connue, et en l'état des connaissances actuelles, il n'est pas évitable. Une des explications serait le dysfonctionnement de lymphocytes T (des cellules du système immunitaire) qui se mettent à éliminer progressivement les cellules β pancréatiques. Les lymphocytes T ne reconnaissent pas les antigènes produits par les cellules β et vont produire des cytokines. Ces cytokines peuvent induire une réponse inflammatoire en produisant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS peuvent perturber les cellules β du pancréas et conduire à la destruction des tissus. Il s'agirait donc d'une maladie auto-immune, détectable par la présence d'autoanticorps (Bluestone et al., 2010).

1.1.3.1. Facteurs de risque

Contrairement au diabète de type 2 qui est associé au vieillissement, le diabète de type 1 va se déclarer dans la majorité des cas à l'âge de l'enfance. Un des facteurs de risque les plus communs est la prédisposition génétique. En effet, la recherche scientifique a montré que si un membre de la famille est atteint du diabète de type 1, la possibilité de le développer augmente sensiblement. Des facteurs environnementaux associés à des gènes de prédisposition peuvent également être à l'origine de cette maladie et ces influences sont encore à déterminer. L'exposition environnementale à des entérovirus pourrait également impacter le système immunitaire en développement chez les enfants. Avec des défenses immunitaires réduites par des virus qui participeraient à la destruction des cellules productrices d'insuline, une maladie auto-immune telle que le diabète de type 1 pourrait se déclarer (Gillespie, 2006).

Plusieurs facteurs liés à l'alimentation et au mode de vie contribuent également à l'incidence du diabète de type 1, tels que l'obésité infantile, la croissance rapide du nourrisson ou encore l'âge élevé de la mère (Tan et al., 2019)

L'apparition d'un diabète de type 1 résulte en réalité d'une interaction complexe de facteurs génétiques, immunitaires et environnementaux qui détruisent la fonction des cellules β pancréatiques.

1.1.3.2. Traitement

Dans les traitements existants du diabète de type 1, l'utilisation de l'insuline exogène pour survivre et éviter les diverses complications macrovasculaires et microvasculaires est la plus commune. Néanmoins, l'insulinothérapie est un traitement lourd et chronique (jusqu'à la fin de sa vie). D'autres alternatives existent comme la greffe d'îlots de Langerhans dans le foie ou la greffe de pancréas. Ces alternatives nécessitent cependant un suivi régulier ou des traitements associés lourds pour les patients sans négliger les possibles rejets de greffe. Le traitement le plus efficace reste la prévention et le dépistage précoce (D'Silva et al., 2016 ; Forbes and Fotheringham, 2017).

L'intérêt actuel de la recherche reste le traitement de la maladie par différentes méthodes comme l'utilisation de thérapie cellulaire pour générer ou régénérer les cellules β pancréatiques par la reprogrammation de cellules souches. La thérapie la plus prometteuse serait l'utilisation d'une immunothérapie contre les lymphocytes T. L'hypothèse serait d'enrayer le processus de la maladie en empêchant les lymphocytes T d'attaquer les cellules β pancréatiques restantes ou bien en utilisant des antigènes spécifiques présents sur les cellules β pour reprogrammer la tolérance du système immunitaire (Warshauer et al., 2020 ; Bluestone et al., 2015).

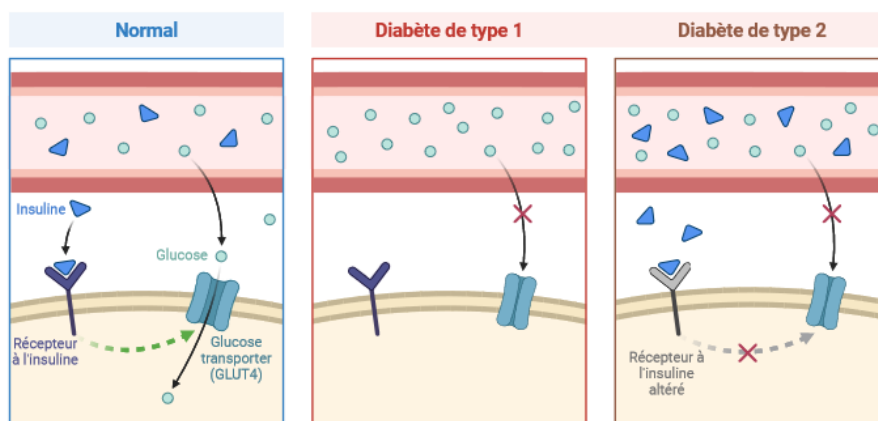


Figure 1 : Définitions de diabètes de type 1 et 2. Created with BioRender.com

1.1.4. Un troisième type de diabète : le diabète gestationnel

Les diabètes de type 1 et 2 sont les formes les plus communes et les plus représentés dans le monde. D'autres types de forme diabétique ont été caractérisés.

Le diabète gestationnel survient durant les grossesses. Seules les femmes enceintes sont touchées par ce diabète. Il se caractérise, tout comme le type 1 ou 2, par une élévation du taux de glycémie au-dessus des valeurs normales établies mais en-dessous des valeurs pathologiques pouvant conduire à un diagnostic de diabète. Le plus souvent, ce type de diabète est diagnostiqué durant le dépistage prénatal. Le risque de diabète durant la grossesse existe par le fait que la grossesse est diabétogène. Physiologiquement pendant cette période un état d'insulinorésistance apparaît, qui va s'aggraver progressivement au cours de la grossesse.

L'augmentation de la demande en insuline est due à l'augmentation de l'apport calorique maternel, à la prise de poids de la mère ou encore à la présence et à l'augmentation d'hormones placentaires. Au fur et à mesure que la grossesse avance, il a été montré que la masse des cellules β du pancréas augmente pour répondre à la demande d'insuline accrue. Un échec de l'expansion des cellules β pancréatiques avec une augmentation relativement inadéquate de la sécrétion d'insuline conduit au diabète gestationnel. En fin de grossesse, le fœtus détourne une quantité croissante de glucose maternel vers lui-même, ce qui entraîne une diminution du taux de glucose maternel. À leur tour, les cellules β pancréatiques augmentent la sécrétion d'insuline pour empêcher une livraison excessive de glucose au fœtus. Cette augmentation de production de glucose associée à une augmentation non adéquate d'insuline conduit à une hyperglycémie en dessous des valeurs diagnostiquées traditionnellement pour un diabète (Lende et Rijhsinghani, 2020 ; Johns et al., 2018). Ce diabète gestationnel augmente le risque de complications durant la grossesse et à l'accouchement pour la mère et son futur enfant. Ce diabète est susceptible d'augmenter le risque d'avoir un diabète de type 2 dans un avenir plus ou moins lointain.

1.1.5. Complications liées au diabète connues

Le diabète est associé à un certain nombre de complications et peut augmenter le risque général de décès prématuré. Les complications métaboliques aiguës associées à la mortalité comprennent l'acidocétose diabétique due à des concentrations exceptionnellement élevées de glucose dans le sang (hyperglycémie) et le coma résultant d'une hypoglycémie (faible taux de glucose dans le sang). Les complications vasculaires à long terme sont très variées et sont dues,

au moins en partie, à l'élévation chronique du taux de glucose dans le sang, qui entraîne une détérioration des vaisseaux sanguins (angiopathie).

Dans le cas des 2 types de diabète, ces complications qui en résultent sont regroupées en complications microvasculaires (dues à l'endommagement des petits vaisseaux sanguins) et macrovasculaires (dues à l'endommagement des artères). Les complications microvasculaires comprennent les maladies oculaires ou "rétinopathie", les maladies rénales appelées "néphropathie", et les dommages neuraux ou "neuropathie". Les principales complications macrovasculaires comprennent les maladies cardiovasculaires accélérées entraînant un infarctus du myocarde et les maladies cérébrovasculaires se manifestant par des accidents vasculaires cérébraux. La dépression, la démence et le dysfonctionnement sexuel sont d'autres complications chroniques du diabète (Forbes et Cooper, 2013).

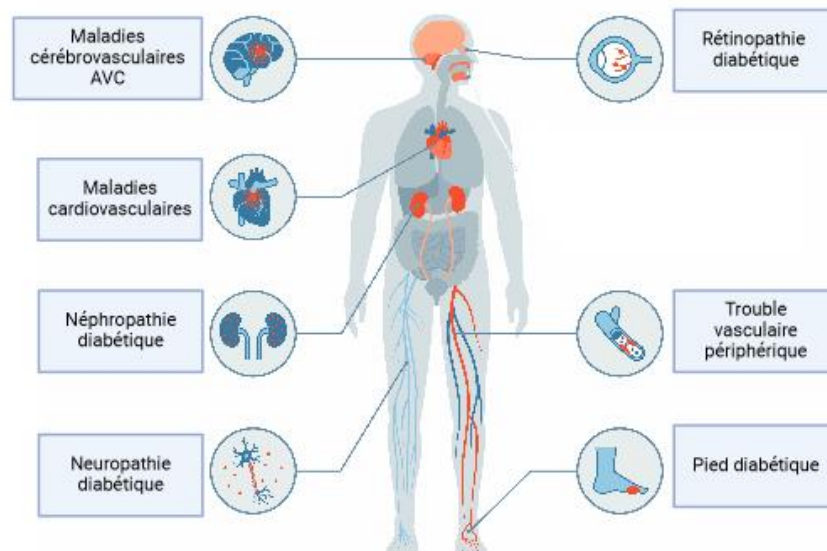


Figure 2 : Schéma des différentes complications diabétiques communes. Created with BioRender.com

1.1.5.1. Macroangiopathies

Les maladies cardiovasculaires affectent le cœur et les vaisseaux sanguins et peuvent entraîner des complications mortelles telles que la coronaropathie (qui peut conduire à un infarctus du myocarde) et l'accident vasculaire cérébral. Les maladies cardiovasculaires sont la cause la plus fréquente de décès chez les personnes atteintes de diabète de type 2. Des taux élevés de glucose sanguin peuvent rendre le système de coagulation sanguine plus actif, ce qui augmente le risque de formation de caillots sanguins. L'hypertension artérielle,

l'hypercholestérolémie, l'hyperglycémie et d'autres facteurs de risque contribuent à augmenter le risque de complications cardiovasculaires (Jia et al., 2018).

1.1.5.2. Microangiopathies connues

1.1.5.2.1. Neuropathies

L'hyperglycémie peut causer des dommages aux nerfs dans tout l'organisme. La complication la plus fréquente liée au diabète est la neuropathie, dont la polyneuropathie symétrique distale (appelée neuropathie diabétique) est très courante. La neuropathie diabétique est une altération des activités normales des nerfs dans l'ensemble du corps et peut modifier les fonctions autonomes, motrices et sensorielles. La neuropathie périphérique est la forme la plus courante de neuropathie diabétique, affectant les nerfs externes des membres, en particulier ceux des pieds. Elle est également caractérisée par une forte douleur constante et une morbidité substantielle. Elle altère principalement les fonctions sensorielles, provoquant des sensations anormales et un engourdissement progressif qui facilite le développement d'ulcères (pied diabétique) et, dans certains cas, peut entraîner une amputation du membre.

L'hyperglycémie associée à une altération de la signalisation de l'insuline, entraînent plusieurs altérations pathologiques dans les neurones, la glie et les cellules vasculaires qui peuvent conduire à un dysfonctionnement nerveux et, en fin de compte, à une neuropathie. Cependant, les mécanismes distincts qui sous-tendent la neuropathie dans le diabète de type 1 et de type 2 restent inconnus. Certaines hypothèses existent comme une association avec des dysfonctionnements des vaisseaux sanguins proche de nerfs périphériques ou des troubles dans la voie de signalisation de l'insuline. Ces troubles induiraient une cascade métabolique qui peut être formée par un flux accru de la voie des polyols qui métabolise le glucose inutilisé en présence d'enzymes. La libération excessive de cytokines, l'activation de la protéine C kinase et le stress oxydatif excessif résultant de l'hyperglycémie sont également des éléments clés du développement du dysfonctionnement des nerfs périphériques. Cette association contribuerait à l'apoptose cellulaire, des lésions de l'ADN, un stress du réticulum endoplasmique, un dysfonctionnement mitochondrial, une neurodégénérescence, une perte de la signalisation neurotrophique et à la réduction du flux sanguin nerveux (Kim et al., 2012).

L'importance de ces voies dans le développement de la neuropathie varie en fonction du type de cellule, du profil de la maladie et du temps, car les différents types de cellules sont plus ou moins susceptibles de subir des lésions en fonction des déficiences métaboliques.

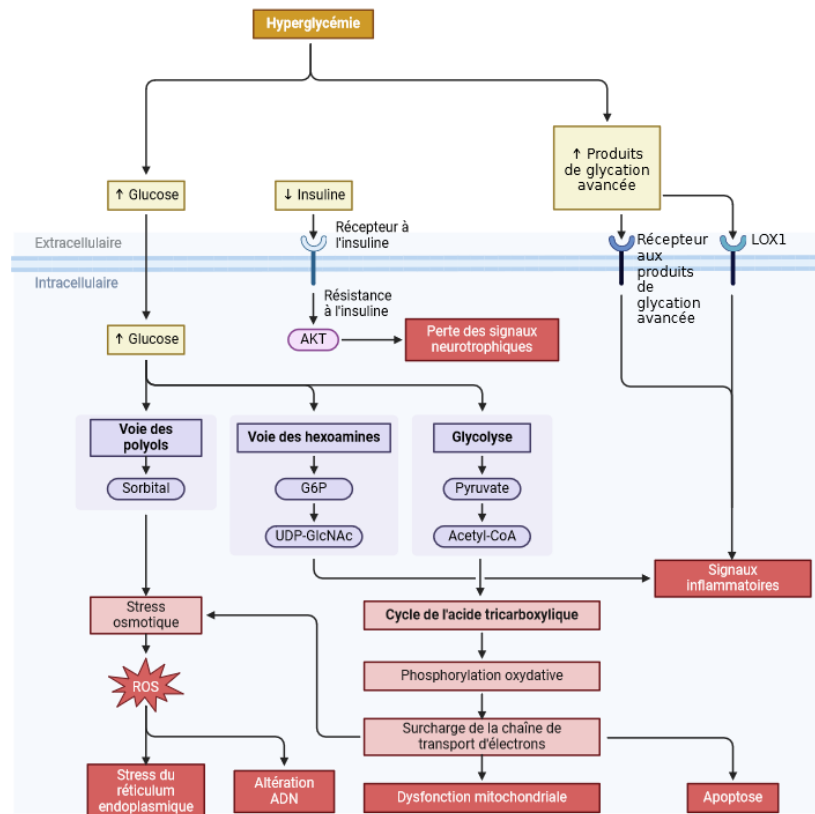


Figure 3: Pathogénèse de la neuropathie diabétique. D'après Feldman et al., 2019. Created with BioRender.com

La neuropathie des nerfs périphériques est le résultat d'une atteinte des nerfs périphériques, notamment la neuropathie à petites fibres impliquant des nerfs myélinisés ($A\delta$), ainsi que des nerfs non myélinisés (fibres C non myélinisées). Dans la neuropathie périphérique, les petites fibres somatiques et autonomes peuvent être affectées. Les petites fibres contrôlent la perception thermique, la perception de la douleur et les fonctions autonomes telles que les fonctions cardiaques, pulmonaires ou entériques. En cas de neuropathie diabétique, les fibres c non myélinisées sont affectées en premier suivies des fibres $A\delta$ et enfin des grosses fibres myélinisées $A\beta$. Cette complication peut survenir dans les tout premiers stades de la maladie. Sa détection peut aider les médecins à mieux prendre en charge leurs patients et à éviter les complications avancées (Feldman et al., 2019).

1.1.5.2.2. Néphropathies

Les maladies rénales (néphropathie) sont beaucoup plus fréquentes chez les personnes diabétiques que chez les personnes non diabétiques. Elle est causée par une lésion des petits vaisseaux sanguins, ce qui peut entraîner une diminution de l'efficacité des reins, voire leur défaillance totale. La néphropathie diabétique représente la cause principale de l'insuffisance rénale. Les maladies rénales sont également un facteur de risque majeur pour le développement de complications macrovasculaires telles que les crises cardiaques et les accidents vasculaires cérébraux. L'hypertension et un mauvais contrôle de la glycémie précèdent souvent une néphropathie diabétique. Le développement et la progression de la néphropathie sont très complexes étant donné la diversité des populations cellulaires présentes dans le rein et les divers rôles physiologiques de cet organe. Des concentrations élevées de glucose induisent des effets cellulaires spécifiques, qui affectent diverses cellules rénales résidentes. La réponse inflammatoire avec l'activation des voies induisant un stress oxydatif contribue un rôle dans le développement de la néphropathie diabétique (Papadopoulou-Marketou et al., 2017).

1.1.5.2.3. Rétinopathies

La rétinopathie diabétique est le résultat direct d'une hyperglycémie chronique causant des dommages aux capillaires rétiens, entraînant des fuites et des blocages capillaires. Elle peut entraîner une perte de la vision et éventuellement la cécité. Elle se caractérise par des modifications de la perméabilité vasculaire, des microanévrismes capillaires, une dégénérescence capillaire et une formation excessive de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation). La rétine neurale est également dysfonctionnelle avec la mort de certaines cellules, ce qui modifie l'électrophysiologie de la rétine et entraîne une incapacité à distinguer les couleurs. La rétinopathie diabétique constitue la principale cause de cécité chez les adultes (Frank, 2004).

Tous les résultats sur les recherches sur le diabète tendent à montrer les rôles de l'atteinte génétique et de l'inflammation dans les voies de signalisation du glucose et de l'insuline. Ces réactions métaboliques contribuent à une meilleure compréhension de la pathogenèse de cette maladie et de ses complications liées que ce soit pour le diabète de type 1 ou de type 2. La question est de savoir quelle autre complication pourrait être liée à un diabète et l'utilisation de modèles animaux est primordiale pour comprendre les mécanismes sous-jacents de cette maladie.

1.2. Chez l'animal

Dans le monde de la recherche, les modèles animaux ont toujours joué un rôle essentiel dans l'exploration et la caractérisation de la physiopathologie des maladies et l'identification des cibles, ainsi que dans l'évaluation de nouveaux agents thérapeutiques et de traitements *in vivo*. Dans la recherche sur le diabète depuis un siècle, le rôle des animaux est primordial dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'état diabétique et de ses complications associées. Les modèles animaux jouent également un rôle central dans les interventions thérapeutiques et de prévention réussies qui sont applicables aujourd'hui pour les patients diabétiques (King et Bowe, 2016 ; Al-awar et al., 2016).

1.2.1. *Modèle diabétique*

Il existe de nombreux modèles animaux de diabète. Cependant, selon la manière dont l'animal développe le diabète varie en fonction de la question expérimentale. Les deux grandes catégories de recherche sur le diabète comprennent la caractérisation de la pathogenèse et de la prévention de l'apparition de la maladie, ainsi que la recherche sur le traitement de la maladie.

Dans les études visant à comprendre la pathogenèse de la maladie, deux stratégies principales peuvent être utilisées. La stratégie la plus courante consiste à utiliser un modèle animal dans lequel le processus pathologique ressemble à la condition humaine. Une autre possibilité consiste à utiliser des manipulations génétiques pour évaluer l'importance de gènes spécifiques dans le développement de la maladie. Très souvent, ces stratégies sont utilisées conjointement. Pour prévenir l'apparition de la maladie, il est important que certains éléments de la pathogenèse reflètent la maladie humaine et, par conséquent, des modèles similaires sont souvent utilisés.

Des modèles animaux ont été créés pour chaque type de diabète pour comprendre la pathogenèse qui est différente selon le type de diabète en reproduisant le plus fidèlement possible les symptômes et les facteurs de risque que l'on retrouve dans la pathologie humaine. Différentes revues scientifiques résument l'utilisation des modèles animaux dans la recherche sur le diabète (Kottaisamy et al., 2021 ; Al-awar et al., 2016 ; King et Bowe, 2016 ; Graham et Schuurman, 2015 ; King, 2012).

1.2.1.1. Modèles de Diabète de type 2

Pour rappel, le diabète de type 2 se caractérise par une résistance à l'insuline et l'incapacité des cellules β pancréatiques à compenser suffisamment (Park et al., 2021). Par conséquent, les modèles animaux du diabète de type 2 ont tendance à inclure des modèles de résistance à l'insuline et/ou des modèles de défaillance des cellules β pancréatiques. De nombreux modèles animaux de diabète de type 2 ont comme principale caractéristique d'être obèse, ce qui reflète la condition humaine où l'obésité est un facteur de risque prédominant et étroitement liée au développement du diabète de type 2 (McMurray et Cox, 2011).

Les modèles animaux de diabète de type 2 sont obtenus soit par manipulation génétique, soit de manière induite. Les modèles génétiques modifiés peuvent être obtenus de différentes manières en agissant sur un seul gène ciblé ou bien sur plusieurs gènes qui peuvent être les caractéristiques d'une autre pathologie. Le modèle le plus fréquent est la souris $Lepr^{ob/ob}$ ou $Lepr^{db/db}$. Ce modèle obèse développe une hyperphagie et une hyperinsulinémie causé par un dysfonctionnement dans la voie de signalisation de la leptine, hormone qui régule les réserves en graisses et donne la sensation de satiété. D'autres modèles animaux obèses existent comme le rat gras Zucker qui lui aussi est obtenu par une mutation sur le récepteur de la leptine (Wang et al., 2014).

La souris obèse diabétique Tsumura Suzuki a été créée comme modèle polygénique du diabète de type 2 par l'élevage sélectif de mâles obèses de la souche ddY (souche répandue au Japon), en utilisant les indices de poids corporel élevé et de présence de glucose dans l'urine. Cette souris présente les caractéristiques du diabète de type 2 chez l'humain, telles que la polyphagie, l'obésité sévère, l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie et l'hyperlipidémie. Des complications telles que l'altération de la fonction motrice des membres postérieurs due à une neuropathie périphérique et une légère néphropathie ont été retrouvés dans ce modèle (Tsuda et al., 2016).

Les modèles d'obésité induite couramment utilisés car ne nécessitant un coût trop important, sont obtenus en nourrissant les animaux (surtout des rongeurs) par un régime riche en matières grasses. Le taux de lipides dans cette nourriture est beaucoup plus conséquent que le taux présent dans la nourriture normale donnée aux rongeurs. Le gain de poids est significativement visible au bout de quelques semaines et est surtout associé à une insulino-résistance (O'Brien et al., 2014 ; Heydemann, 2016).

Ces modèles sont surtout utilisés pour comprendre le rôle de la résistance à l'insuline et de l'obésité dans le diabète de type 2. Pour comprendre le rôle de l'atteinte de la compensation des cellules β pancréatiques dans ce diabète, des modèles de pancréatectomie partielle ont été créés chez la souris mais ce modèle n'est pas le plus pertinent aujourd'hui (Hardikar et al., 1999).

1.2.1.2. Modèles de Diabète de type 1

Le diabète de type 1 a pour principale caractéristique, la destruction auto-immune des cellules β pancréatiques, qui entraîne une absence de production d'insuline causant une hyperglycémie chronique sévère. Cette maladie nécessite un suivi régulier et un apport d'insuline exogène au quotidien (DiMeglio et al., 2018). Dans les modèles animaux, ce déficit de production d'insuline est obtenu par une variété de mécanismes différents, allant de l'ablation chimique des cellules β du pancréas à l'élevage de rongeurs qui développent spontanément un diabète auto-immun en passant par la création de modèles génétiquement induits.

1.2.1.2.1. Modèle spontané auto-immun

Le modèle spontané auto-immun a été créé il y a environ 50 ans après la découverte sur des rongeurs d'une hyperglycémie développée spontanément (Kolb, 1987). Cela a conduit au développement de deux modèles de diabète auto-immun : la souris diabétique non obèse (dit NOD Non-Obese Diabetic) et le rat Bio-Breeding. La pathophysiologie de cette maladie développée chez ces rongeurs présente de nombreuses similitudes avec le diabète de type 1 chez l'homme. Les symptômes typiques (hyperglycémie, perte de poids) se déclarent quelques semaines après la naissance des rongeurs. Ces modèles polygéniques ont contribué à une meilleure compréhension du diabète auto-immun concernant l'implication du dysfonctionnement des lymphocytes T. La souris diabétique non obèse a fourni des outils pour étudier les lésions auto-immunes des cellules β pancréatiques et ont facilité le développement de la détection précoce, de la prévention et du traitement du diabète de type 1 (Aubin et al., 2022 ; Lenzen, 2017 ; Mullen, 2017). Cependant, ce modèle n'est pas le plus approprié pour évaluer et caractériser les complications macroangiopathiques et microangiopathiques causées par le diabète de type 1 notamment la neuropathie diabétique (Driver et al., 2011 ; Obrosova et al., 2005).

1.2.1.2.2. Modèle induit génétiquement

Comme pour les modèles animaux de diabète de type 2, des modèles induits génétiquement de diabète de type 1 existent mais ils sont peu répandus dans la littérature scientifique. Seul un modèle murin est utilisé dans la recherche : la souris Akita. Cette souris a été conçue au Japon à partir d'une souche C57Bl/6N qui a développé une mutation spontanée du gène de l'insuline 2 qui empêche le traitement correct de la proinsuline. Un diabète insulino-dépendant sévère se déclare à partir de l'âge de 3 à 4 semaines, caractérisé par une hyperglycémie, une hypoinsulinémie, une polyurie et une polydipsie. L'absence quasi-totale de cellules β du pancréas dans ce modèle en fait une alternative aux souris traitées à la streptozotocine (STZ) dans les études de transplantation et peut également être utilisé dans des études de diabète de type 2 (King, 2012 ; Mathews et al., 2002). Il a également été utilisé comme modèle de maladie macrovasculaire diabétique et de neuropathie (Obrosova, 2011).

1.2.1.2.3. Modèle induit chimiquement

Dans les modèles de diabète de type 1 induits chimiquement, un pourcentage élevé de cellules β pancréatiques est détruit et la production d'insuline est donc faible, ce qui entraîne une hyperglycémie et une perte de poids (Furman, 2021). Le diabète induit chimiquement constitue non seulement un modèle simple et relativement bon marché de diabète chez les rongeurs. Deux composés principaux sont utilisés pour induire le diabète : la streptozotocine (STZ) ou l'alloxane.

En raison de leur similitude de structure avec le glucose, le glucose peut entrer en compétition avec l'alloxane et la STZ, et les animaux à jeun ont donc tendance à être plus sensibles. L'alloxane et la STZ sont relativement instables et les solutions doivent idéalement être préparées immédiatement avant l'injection (Radenkovic et al., 2016). Ils sont utilisés prioritairement dans des études sur de nouveaux traitements de l'insuline et de thérapies de transplantation de cellules β pancréatiques dont le point final est la diminution de la glycémie. Ces modèles sont avant tout de simples modèles rapides d'induction d'une hyperglycémie (King et Bowe, 2016 ; Deeds et al., 2011).

1.2.1.2.3.1. *Alloxane*

L'alloxane sous son appellation chimique 5,5-dihydroxyl pyrimidine-2,4,6-trione est un composé organique et un analogue cytotoxique du glucose. Il a deux effets pathologiques

distincts : il inhibe sélectivement la sécrétion d'insuline induite par le glucose grâce à l'inhibition spécifique de la glucokinase, le capteur de glucose de la cellule β pancréatique, et il provoque un état de diabète insulino-dépendant grâce à sa capacité à induire la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui entraîne l'apoptose sélective des cellules β pancréatiques. Ces deux effets peuvent être attribués aux propriétés chimiques spécifiques de l'alloxane, le dénominateur commun étant l'absorption cellulaire sélective et l'accumulation de l'alloxane par la cellule β pancréatique (Lenzen, 2008). Les doses chez la souris varient de 50 à 200 mg/kg et chez le rat de 40 à 200 mg/kg, en fonction de la souche et de la voie d'administration (Radenkovic et al., 2016). Cette molécule est cependant de moins en moins utilisée dans la recherche sur le diabète de type 1 au profit de la STZ.

1.2.1.2.3.2. *Streptozotocine (STZ)*

La STZ, connue chimiquement sous le nom de N(méthylnitrosocarbamoyl)- α -D-glucosamine, est un composé naturel produit par *Streptomyces achromogenes* avec des propriétés antibactériennes qui sont sélectivement absorbées par les cellules β du pancréas, provoquant leur destruction. Il est décrit comme diabétogène et également un analogue cytotoxique du glucose comme l'alloxane (Rakieten et al., 1963). La STZ est le produit chimique le plus couramment utilisé pour l'induction du diabète de type 1 chez les modèles animaux. Il s'agit d'un composé nitrosourée avec un glucose toxique et un analogue de la N-acétyl glucosamine qui s'accumule dans les cellules β du pancréas par l'intermédiaire du transporteur GLUT-2. La STZ peut induire le diabète chez les rats, les souris et d'autres animaux de deux manières différentes en fonction de la dose.

À une injection à forte dose, la STZ cible les cellules β pancréatiques. Une unique injection de STZ est administrée à des souris par voie intraveineuse ou intrapéritonéale (100-200 mg/kg) ou à des rats (35-65 mg/kg), entraîne une destruction massive des cellules β pancréatiques avec une production d'insuline faible ou nulle. La STZ est donc véhiculée par une protéine transport de glucose appelée GLUT-2 vers les cellules β car la structure chimique de la STZ ressemble à celle du glucose. Le STZ provoque une alkylation de l'ADN qui conduit à l'activation de la voie de signalisation PARP et à la production de ROS, ce qui entraîne une réduction de la teneur en ATP (dysfonctionnement mitochondrial) et une inhibition de la sécrétion d'insuline. En outre, le STZ est une source de radicaux libres qui contribue à endommager l'ADN. Finalement, les lésions de l'ADN couplées à l'épuisement de l'énergie conduisent à la mort des cellules β du pancréas (Lenzen, 2008 ; Wilson et Leiter, 1990). Cette

technique est la plus utilisée dans la littérature scientifique pour la rapidité d'induire une hyperglycémie sévère (moins de 48h) (Furman, 2021).

Pour une technique utilisant de faibles doses de streptozotocine (20-40 mg/kg selon la souche) administrées pendant 4 ou 5 jours consécutifs à des souris ou des rats. Cela induit une insulite (inflammation des cellules β) dans laquelle les cytokines pro-inflammatoires dérivées de macrophages provoquent la mort des cellules β . Cependant ce modèle ne dépend pas des lymphocytes T et B et diffère donc du diabète de type 1 chez l'humain. Ce modèle est souvent utilisé en complément d'un modèle auto-immun spontané comme preuve supplémentaire dans les stratégies de prévention (Wu et Huan, 2007).

1.2.1.2.4. Autres modèles

D'autres modèles animaux de diabète de type 1 existent par l'utilisation de virus. Peu d'études ont utilisé ce modèle animal. Certains virus comme le virus coxsackie B ou le virus de l'encéphalomyocardite ont été utilisés pour induire un diabète de type 1 en participant à la dégradation et à l'injection des cellules β pancréatiques. Des modèles de cochon et de primates non humains sont également utilisés dans la recherche pour le diabète de type 1. Ces modèles se rapprochent plus de l'humain et sont essentiellement pour la recherche de thérapies géniques et de transplantation de cellules β . Pour ces modèles non rongeurs, la technique privilégiée pour induire un diabète de type 1 est la pancréatectomie totale ou partielle (Graham et Schuurman, 2015).

1.2.1.2.5. Modèle neuropathique diabétique

L'hyperglycémie est la principale caractéristique des diabètes de type 1 et de type 2. En raison de sa nature subtile et chronique, l'hyperglycémie joue un rôle clé dans le développement des complications diabétiques. On a constaté que le mécanisme sous-jacent à la pathogenèse de ces complications diabétiques est le stress oxydatif formé par la surproduction de ROS. Il peut également être dû à des défauts dans la voie de transduction du signal de l'insuline qui est une voie clé impliquée dans le maintien de l'homéostasie du glucose (Feldman et al., 2019 ; Feldman et al., 2017). Un certain nombre de modèles animaux sont utilisés pour étudier les complications du diabète.

Tous les modèles animaux du diabète ont leurs caractéristiques propres pour induire un diabète. En effet, sur les études travaillant sur les complications diabétiques, certains modèles vont exprimer mieux que d'autres l'effet souhaité. Pour un modèle de néphropathie diabétique, la souris induite génétiquement $Lepr^{ob/ob}$ est la plus pertinente en présentant des atteintes rénales telles que des glomérules hypertrophiés et une sclérose mésangiale (Alpers et Hudkins, 2011). Les souris Akita ou $Lepr^{db/db}$ sont les plus conseillées pour des études sur la rétinopathie diabétique avec un épaissement de la rétine et une diminution des cellules ganglionnaires de la rétine (Giocanti-Auregan et al., 2013).

Pour les modèles murins du diabète de type 1, le modèle induit par la STZ à haute dose est le plus utilisé dans l'étude de la neuropathie diabétique. Avec l'induction de la STZ chez la souris, la taille des fibres des nerfs périphériques ainsi que la taille de l'axone sont réduites deux fois plus que celle de la gaine de myéline. Ces changements anatomiques permettent de comprendre les vitesses de conduction nerveuse motrice et sensorielle réduites observées chez les souris diabétiques. Ces changements sont accompagnés d'une sensation de douleur. Le modèle induit chimiquement de la STZ est donc utilisé pour étudier le développement, la progression et les options thérapeutiques de la neuropathie diabétique. Sur le modèle utilisant la STZ à faible dose, peu d'atteintes des nerfs périphériques ont été signalées (O'Brien et al., 2014 ; Sullivan et al., 2007 ; Obrosova et al., 2005).

Pour les modèles murins du diabète de type 2, le modèle de souris induit génétiquement C57BL/ Ks ($Lepr^{db/db}$) est également largement utilisé dans l'étude de la neuropathie diabétique. Ce modèle développe des symptômes tels qu'une diminution de la conduction nerveuse sensorielle, de la vitesse et de la densité des fibres nerveuses intra-épidermiques 12 semaines après la naissance. Ces symptômes témoignent de l'apparition de la neuropathie diabétique et ces modèles sont donc exploités pour étudier l'apparition et la progression de la neuropathie diabétique (Sullivan et al., 2007).

Dans l'intérêt du projet, les modèles de neuropathie diabétique ont été privilégiés par l'obtention d'atteinte des nerfs périphériques qui peut être retrouvé au niveau du système auditif.

Etude n°1 - Induction d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur des modèles murins

I) Preuve de concept

Dans le cadre de notre travail de thèse, avant d'étudier le lien entre le diabète et la perte d'audition, il était primordial d'étudier la physiopathologie du diabète et ses complications associées telles que la neuropathie périphérique, une des plus communes. Les mécanismes distincts qui sous-tendent la neuropathie dans le diabète de type 1 et de type 2 restent inconnus. Le diagnostic de la neuropathie périphérique diabétique chez les patients consiste à rechercher la présence de symptômes sensoriels anormaux, de déficits de la vitesse de conduction nerveuse et de diminutions de la densité des fibres myélinisées et/ou des fibres nerveuses intra-épidermiques.

Afin d'appréhender les mécanismes cellulaires de la pathogenèse et de pouvoir par la suite envisager des approches thérapeutiques et la mise en place d'action de prévention des complications diabétiques -et principalement la neuropathie périphérique-, de nombreux modèles animaux (essentiellement chez la souris et le rat) ont été décrits dans la littérature scientifique. Il est ainsi possible de disposer de modèles animaux développant une pathologie « diabétique » élaborés à l'aide d'approches génétiques ou suite à l'administration de molécules diabéto-gènes.

Ces modèles animaux reproduisent fidèlement le phénotype métabolique hyperglycémique permettant d'approcher un modèle de diabète de type 1. Si ces modèles animaux développent une neuropathie périphérique diabétique, cependant ils ne reflètent pas la gravité de la neuropathie périphérique diabétique humaine et ne présentent que des déficits neurophysiologiques légers (O'Brien et al. 2014 ; Beiswenger et al. 2008; Li et al. 2005; Sullivan et al. 2007).

L'objectif de cette étude n°1 est d'induire par une approche pharmacologique, un syndrome métabolique hyperglycémique développant une neuropathie périphérique à l'aide d'une injection de streptozotocine sur 3 souches de souris d'âge jeune (éviter le biais du facteur de risque de l'âge) : C57Bl/6JrJ, C57/Bl6NrJ et CBA/JrJ.

II) Méthodes : Protocole expérimental d'induction

La streptozotocine (STZ) est une substance chimique diabéto-gène qui est susceptible de provoquer (ou aggraver) un diabète (Lenzen 2008). L'ablation chimique des cellules β du pancréas par la STZ est l'approche la plus courante en expérimentation préclinique pour induire un diabète de type 1 sur des modèles animaux de souris ou de rat.

Dans la littérature, certains auteurs décrivent des protocoles d'induction d'hyperglycémie pathologique chronique suite à l'administration de plusieurs doses faibles consécutives de STZ (50 mg/kg/jour pendant 5 jours) (Jolival et al., 2016).

Pour cette étude, à l'aide de la STZ, nous souhaitons induire un syndrome métabolique hyperglycémique (SMH)

1) sur 3 souches de souris : C57/Bl6JrJ, C57/Bl6NrJ et CBA/JrJ (souris mâles âgées de 6 semaines au moment d'induction du SMH).

2) avec « *taux de réussite* » d'induction le plus proche des 100% des animaux traités

2) avec une cinétique du taux de glycémie des animaux traités évoquant l'installation rapide et stable de ce SMH (*en quelques jours lors d'un suivi quotidien*).

3) à l'aide d'une seule dose de STZ administrée par une seule injection intra-péritonéale

Pour chaque souche de souris étudiée, C57Bl/6JrJ, C57/Bl6NrJ et CBA/JrJ, et comparativement à un groupe de souris contrôle, 3 groupes différents de souris recevront respectivement (après une mise à jeun de 4h avant injection) une seule injection IP de STZ à une dose soit de 150 mg/kg, soit de 200 mg/kg soit de 125 mg/kg.

Nous examinerons, pour chacune des 3 souches de souris étudiées, l'impact de l'administration de STZ (selon 3 doses différentes, par injection IP).

A- un suivi quotidien du poids (*en gramme*)

B- un suivi quotidien du taux de glycémie (*mesure suite à une ponction sanguine caudale, statut de SMH si le taux de glycémie > 300mg/dL*)

C- un suivi de la vitesse de conduction neurale caudale (en m/s)

III) Protocole n°1 : Syndrome métabolique hyperglycémique sur la souche de souris C57Bl/6JrJ

Dans un premier temps, nous avons examiné sur la souche de souris C57Bl/6JrJ l'impact de l'administration de STZ (selon 3 doses différentes, par injection IP).

Notre choix s'est tout d'abord porté sur de cette souche C57Bl/6JrJ car il s'agit d'une souche de souris très étudiée dans le domaine des études précliniques sur le « diabète », et plus particulièrement sur la neuropathie diabétique (O'Brien et al., 2014).

A) Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 150 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ

Evolution du taux de glycémie suite à l'administration de STZ₁₅₀

Lors de cette première série d'expérimentation, nous avons constitué un groupe contrôle de 10 souris mâles et un groupe de 10 souris mâles traitées STZ₁₅₀. Lors de l'administration de la STZ₁₅₀, toutes les souris étaient âgées de 6 semaines.

Suite à l'administration d'une dose unique STZ₁₅₀, le taux moyen de glycémie (Gly) des animaux traités présente une augmentation lors de la mesure effectuée à 7 jours après administration de STZ₁₅₀ (Gly_{t0-STZ150} = 157,8 ± 23,5 mg/dL; Gly_{7j-STZ150} = 193,4 ± 41,9 mg/dL). Chez les animaux traités STZ₁₅₀, cette augmentation a été constante durant les 8 semaines (56 jours) de suivi après l'administration de STZ₁₅₀ (Gly_{56j-STZ150} = 318,6 ± 134,4 mg/dL). Les souris contrôles présentent eu une glycémie stable sur les 8 semaines de suivi (Gly_{t0-ctl} = 148,8 ± 20,7 mg/dL, Gly_{56j-ctl} = 158,7 ± 22,9 mg/dL).

Cependant, en examinant de près le statut glycémique des souris traitées, seulement 2 souris sur les 10 souris recevant de la STZ₁₅₀ montrent une hyperglycémie atteignant le seuil hyperglycémie pathologique défini (300 mg/dL) 14 jours après l'injection. Cette augmentation de la glycémie est significative par rapport aux souris contrôles. Le reste des souris (8 sur 10 souris traitées STZ₁₅₀) recevant une administration de STZ₁₅₀ ont une hyperglycémie légère significative par rapport aux souris contrôles sans atteinte du seuil hyperglycémie pathologique (*cf.* Figure 1 panel A).

Evolution du poids corporel suite à l'administration de STZ₁₅₀

Pour la mesure du poids corporel (PC) et durant 8 semaines de suivi, les 10 souris recevant de la STZ₁₅₀ ont montré une prise de poids similaire aux 10 souris contrôles (PC_{56j-STZ150} = 27,1 ± 2,1g, PC_{56j-ctl} = 27,92 ± 1,4 g) (*cf.* Figure 1 panel B).

Evolution de la vitesse de conduction neurale suite à l'administration de STZ₁₅₀

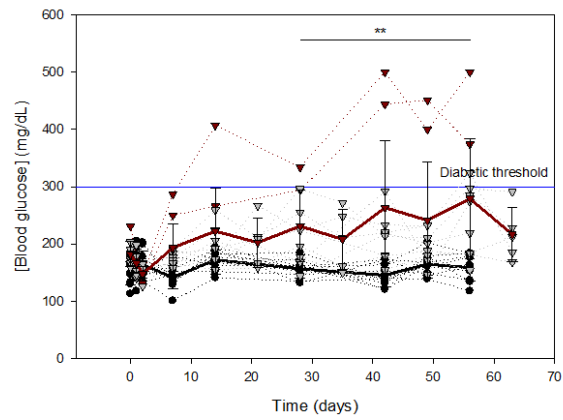
Pour la mesure de la vitesse de conduction neurale (VCN), une augmentation de la vitesse a été visible entre 0 et 3 semaines post-injection puis une stabilisation de cette vitesse a été observée pour les 2 groupes. Aucune différence significative n'a été observée entre les 2 groupes à 9 semaines post-injection (63j) ($VCN_{63j-STZ150} = 24,5 \pm 3,4$ m/s, $VCN_{63j-ctl} = 25,4 \pm 1,6$ m/s) (cf. Figure 1 panel C).

Conclusion protocole 1.1 STZ₁₅₀ chez les souris C57Bl/6JrJ

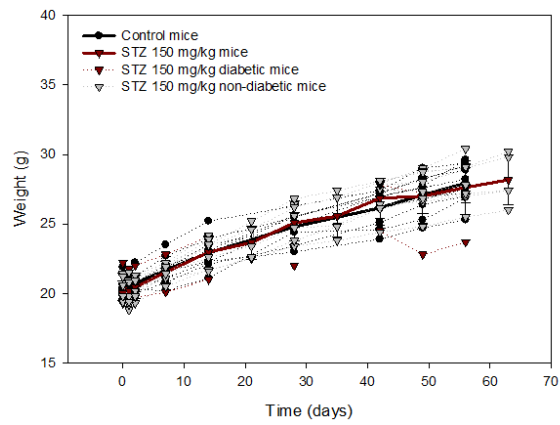
A l'issue de ce protocole examinant l'impact de l'administration d'une dose unique STZ₁₅₀, nous constatons que très peu de souris traitées (2/10) présentent une glycémie supérieure au seuil définissant une hyperglycémie pathologique (14j après l'administration STZ₁₅₀). Par ailleurs, cette injection unique de STZ₁₅₀ n'entraîne aucune modification de la prise de poids ou de la vitesse de conduction du nerf caudal, au cours des 8 semaines de suivi des animaux.

La STZ injectée sur des souris C57Bl/6JrJ à la dose de 150 mg/kg n'a pas permis d'induire un syndrome métabolique hyperglycémique rapidement et de façon stable chez le groupe traité.

A



B



C

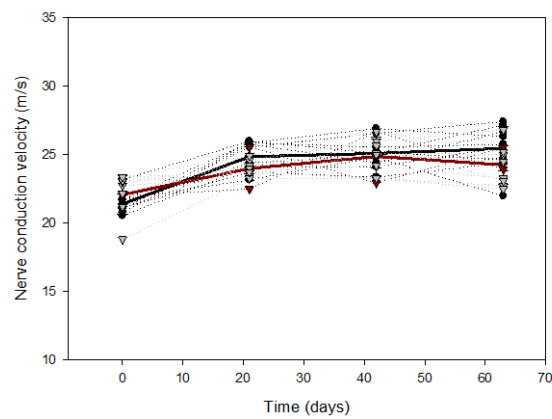


Figure 4 : Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 150 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ

La mesure du taux de glycémie (panel A), du poids corporel (panel B) et de la vitesse de conduction nerveuse caudale (panel C) ont été réalisées pendant 8 semaines après l'administration par une injection unique d'une dose de streptozotocine à la dose de 150mg/kg. Les données moyennées (moyenne \pm écart type) et les données individuelles sont représentées.

T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test $**P < 0.01$.

Taille des groupes : souris contrôles (n=10), souris STZ 150 mg/kg (n=10).

B) Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ

Lors du précédent protocole, l'administration unique de STZ injectée à la dose de 150 mg/kg n'a pas permis d'induire un syndrome métabolique hyperglycémique rapidement et de façon stable chez le groupe traité. Nous examinons dans ce nouveau protocole l'effet de l'administration de STZ injectée à la dose de 200 mg/kg (STZ₂₀₀) sur un groupe de 10 souris mâles traitées, comparativement à un groupe contrôle de 10 souris mâles. Lors de l'administration de la STZ₂₀₀, toutes les souris étaient âgées de 6 semaines.

Evolution du taux de glycémie suite à l'administration de STZ₂₀₀

Après l'injection de STZ₂₀₀, une forte augmentation du taux de glycémie a été observée seulement 2 jours après injection pour les souris traitées (Gly_{2j-STZ200} = 339,5 ± 120,5 mg/dL) par rapport aux souris contrôles (Gly_{2j-ctl} = 148,8 ± 20,7 mg/dL). Cette augmentation s'est stabilisée au-delà des 500 mg/dL (limite supérieure du lecteur de glycémie) de 2 semaines à 8 semaines post-injection.

Suite à l'administration de cette dose unique de STZ₂₀₀, 100 % des souris injectées ont montré une hyperglycémie sévère significative (Gly_{STZ200} > 500 mg/dL) dès la première semaine après d'injection et qui a été maintenue tout au long des 8 semaines de suivi mesure (cf. Figure 2 panel A).

Evolution du poids corporel suite à l'administration de STZ₂₀₀

Pour la mesure du poids corporel, une stabilité du poids corporel a été observée chez les souris traités STZ₂₀₀ entre 0 et 8 semaines (56 jours) de suivi (PC_{t0-STZ200} = 21,2 ± 0,7 g, PC_{t56-STZ200} = 21,6 ± 2,4 g). Cette non-prise de poids chez les souris traités STZ₂₀₀ est associée à l'hyperglycémie observée par rapport aux souris contrôles qui ont une augmentation de leur poids corporel constante le long des 8 semaines de suivi (PC_{t0-ctl} = 20,3 ± 0,6 g, PC_{t56j-ctl} = 27,9 ± 1,4 g) (cf. Figure 2 panel B).

Evolution de la vitesse de conduction neurale suite à l'administration de STZ₂₀₀

L'hyperglycémie et la non-prise de poids corporel observées ont été associée à une diminution de la vitesse de conduction neurale (VCN) entre 0 et 9 semaines (63jours) de suivi (VCN_{t₀-STZ₂₀₀} = 21,8 ± 1,0 m/s, VCN_{63j-STZ₂₀₀} = 19,3 ± 2,7 m/s). Cette diminution de la VCN est significative par rapport aux souris contrôles (VCN_{63j-ctl} = 25,4 ± 1,6 m/s) (cf. Figure 2 panel C).

Conclusion protocole 1.2 STZ₂₀₀ chez les souris C57Bl/6JrJ

Cette évaluation a permis de montrer que la dose de STZ à 200 mg/kg est adaptée pour induire très rapidement (en 2 semaines) un syndrome métabolique hyperglycémique chez les souris C57Bl/6JrJ traitées avec une hyperglycémie sévère associée (>500mg/dL) à une non-prise de poids et à une diminution progressive pathologique de la vitesse de conduction neurale, signe de l'installation d'une neuropathie périphérique.

La STZ injectée sur des souris C57Bl/6JrJ à la dose de 200 mg/kg a permis d'induire un syndrome métabolique hyperglycémique rapidement et stable avec des signes électrophysiologiques de neuropathie périphérique et une cassure de la courbe du poids corporel.

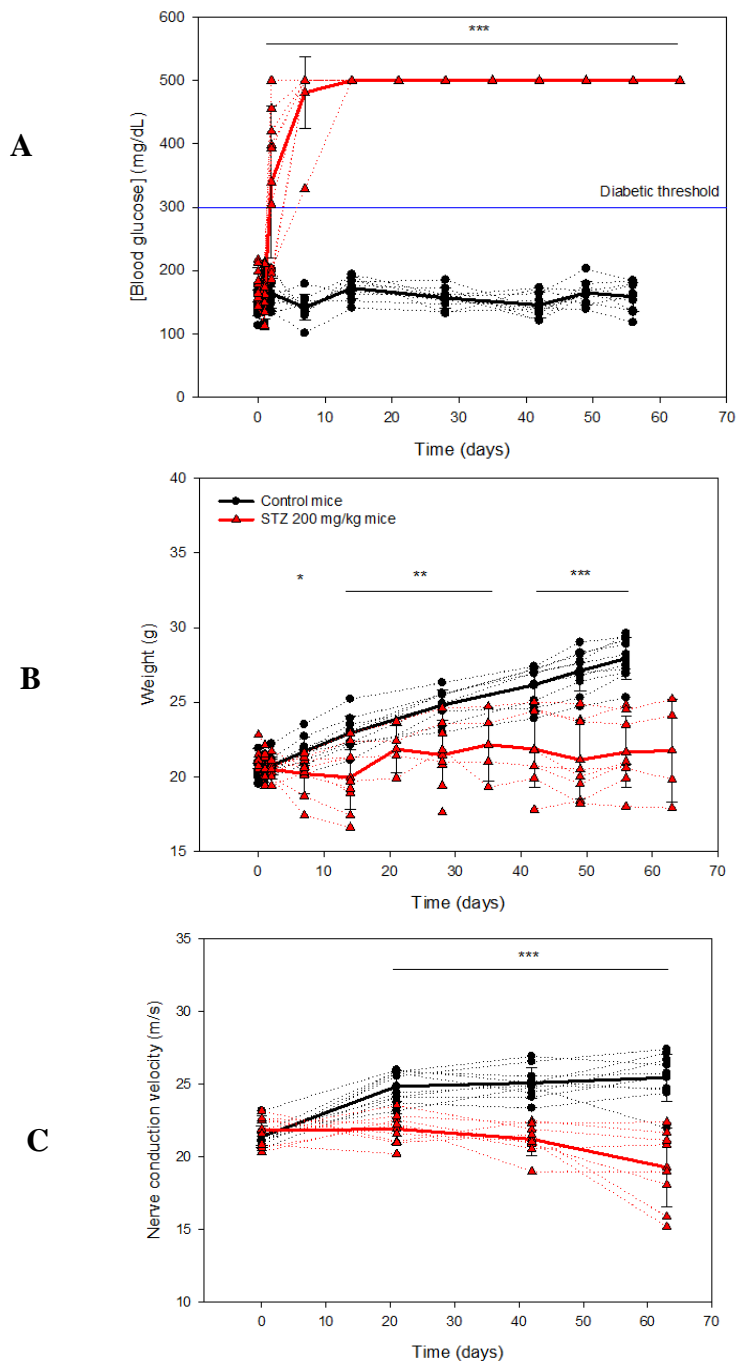


Figure 5 : Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ

La mesure du taux de glycémie (panel A), du poids corporel (panel B) et de la vitesse de conduction nerveuse caudale (panel C) ont été réalisées pendant 8 semaines après l'administration par une injection unique d'une dose de streptozotocine à la dose de 200mg/kg. Les données moyennées (moyenne \pm écart type) et les données individuelles sont représentées. T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test *P<0.05 **P<0.01 Taille des groupes : souris contrôles (n=10), souris STZ 200 mg/kg (n=10)

C) Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 125 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ

En parallèle à cette induction d'un syndrome métabolique hyperglycémique avec une dose de STZ₂₀₀, une autre évaluation a été faite : induire une hyperglycémie sans atteinte du seuil hyperglycémie pathologique du taux de glycémie (300mg/dL) pour mimer une hyperglycémie à « bas bruit », c'est-à-dire sans expression clinique sur les paramètres physiologiques étudiés (poids corporel, vitesse de conduction neurale). Cette réflexion est survenue suite aux résultats obtenus pour l'évaluation de l'administration de la STZ₁₅₀.

Nous examinons dans ce nouveau protocole l'effet de l'administration unique de STZ injectée à la dose de 125 mg/kg (STZ₁₂₅) sur un groupe de 8 souris mâles traitées, comparativement à un groupe contrôle de 11 souris mâles. Lors de l'administration de la STZ₁₂₅, toutes les souris étaient âgées de 6 semaines.

Evolution du taux de glycémie suite à l'administration de STZ₁₂₅

Après injection d'une dose unique de STZ₁₂₅, une augmentation non significative du taux de glycémie est observée pour le groupe traité STZ₁₂₅. Cette augmentation est variable entre les individus avec certaines souris atteignant le seuil hyperglycémie pathologique 8 semaines après injection et d'autres ayant une glycémie proche du groupe contrôle (Gly_{t0-STZ125}= 150,1 ± 11,5 mg/dL, Gly_{56j-STZ125}= 253,8 ± 116,5 mg/dL). Cette variabilité est similaire à l'étude utilisant la dose de STZ₁₅₀. Sur un total de 8 souris injectée STZ₁₂₅, seulement 3 souris injectée STZ₁₂₅ ont eu une hyperglycémie pathologique atteignant le seuil hyperglycémie pathologique (>300mg/dL) (cf. Figure 3 panel A).

Evolution du poids corporel suite à l'administration de STZ₁₂₅

En parallèle à la mesure du taux de glycémie, l'évolution du poids corporel mesuré tout le long des 16 semaines (112 jours) d'évaluation suite à l'administration de STZ₁₂₅ a été similaire entre le groupe traité STZ₁₂₅ et le groupe contrôle (PC_{112j-STZ125}= 28,7 ± 0,9 g, PC_{112j-ctl}= 27,9 ± 1,4 g) (cf. Figure 3 panel B).

Evolution de la vitesse de conduction neurale suite à l'administration de STZ₁₂₅

Ce profil d'évolution identique du poids corporel entre les animaux traités STZ₁₂₅ et les animaux contrôles est retrouvé avec la mesure de la vitesse de conduction neurale. Une stabilité de la vitesse a été mesurée sur 9 semaines (63jours) post injection entre le groupe contrôle et le groupe traité STZ₁₂₅ ($VCN_{63j-STZ125} = 26,4 \pm 1,9$ m/s, $VCN_{63j-ctl} = 25,4 \pm 1,6$ m/s) (cf. Figure 3 panel C).

Conclusion protocole 1.1 STZ₁₂₅ chez les souris C57Bl/6JrJ

Nous avons constaté avec l'administration d'une dose unique STZ₁₅₀ que certaines souris traitées développaient une hyperglycémie pathologique et d'autres avec une hyperglycémie qui n'atteignaient jamais le seuil hyperglycémie pathologique. Nous avons donc souhaité examiner si une dose plus faible pouvait également induire une hyperglycémie à « bas-bruit ».

La STZ injectée sur des souris C57Bl/6JrJ à la dose de 125 mg/kg n'a pas permis d'induire une hyperglycémique à « bas-bruit » c'est-à-dire sans expression clinique sur les paramètres physiologiques étudiés (poids corporel, vitesse de conduction neurale).

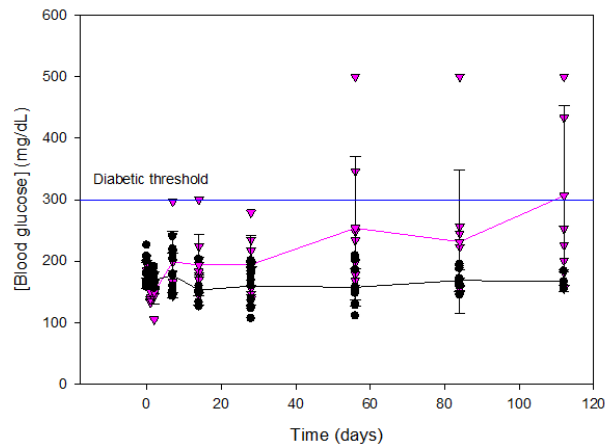
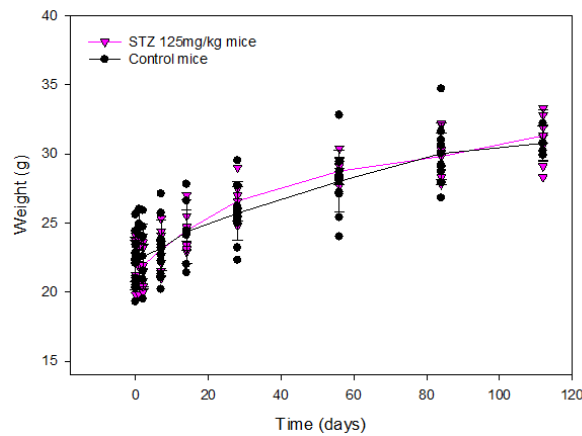
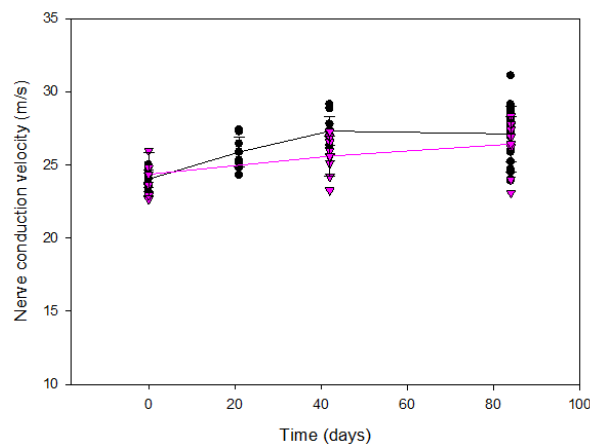
A**B****C**

Figure 6 : Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 125 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ.

La mesure du taux de glycémie (panel A), du poids corporel (panel B) et de la vitesse de conduction nerveuse caudale (panel C) ont été réalisées pendant 16 semaines après l'administration par une injection unique d'une dose de streptozotocine à la dose de 200mg/kg. Les données moyennées (moyenne \pm écart type) et les données individuelles sont représentées.

T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test *P<0.05 **P<0.01

Taille des groupes : souris contrôles (n=11), souris STZ 200 mg/kg (n=8).

Conclusion protocole n° 1 Syndrome métabolique hyperglycémique sur la souche de souris C57Bl/6JrJ

L'objectif de ce protocole n° 1 était d'établir un modèle de syndrome métabolique hyperglycémique (SMH) sur la souche de souris C57Bl/6JrJ. Nous avons ainsi à l'aide d'une dose unique de STZ₂₀₀ injectée en IP constaté une hyperglycémie sévère pathologique (>500mg/dL) et chronique qui est observée 48h après l'administration de STZ₂₀₀. Nous avons également constaté que ce SMH qui est associé avec des altérations de la croissance de la courbe de poids corporel et des mesures électrophysiologiques.

Dans la suite de ce projet, nous reproduirons -sur cette souche de souris C57Bl/6JrJ- ce « modèle » de SMH avec STZ₂₀₀ pour étudier les possibles altérations associées de la fonction auditive (Etude n°2).

De même, nous ne réutiliserons pas les doses STZ₁₅₀ et STZ₁₂₅ qui sont très intéressantes car elles induisent un tableau clinique d'hyperglycémie à « bas-bruit ». En effet, elles ne sont pas associées avec des signes caractéristiques d'une pathologie « diabétique » que sont la perte de poids et la neuropathie périphérique. Néanmoins, cette hyperglycémie à « bas-bruit », qui est très variable d'un individu à l'autre, pourrait sans doute avoir (à plus ou moins long terme) des effets vasculaires et neurologiques subcliniques (sans expression). Cette situation à « bas-bruit » pourrait être retrouvée chez des patients diabétiques dont la pathologie est en cours d'installation et qui s'ignorent malades.

IV) Protocole n°2 : Syndrome métabolique hyperglycémique sur la souche de souris C57Bl/6NrJ

Après avoir testé différentes doses de STZ pour induire un syndrome métabolique hyperglycémique sur une même souche (C57Bl/6JrJ), l'étude sur une autre souche a été envisagée. Une souche proche de la souche C57Bl/6JrJ a été choisie en utilisant la souche C57Bl/6NrJ.

Il y a peu d'études disponibles dans la littérature qui ont utilisé la souche C57Bl/6NrJ qui présente des caractéristiques proches de la C57Bl/6JrJ. Cependant la souche C57Bl/6NrJ n'est pas porteuse de la mutation du gène Nnt (Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase) contrairement à la C57Bl/6JrJ. Elle peut donc servir de témoin - en comparaison à la C57Bl/6JrJ- dans les études métaboliques mettant en jeu les mécanismes de tolérance au glucose.

L'objectif de ce second protocole est d'examiner sur la souche de souris C57Bl/6NrJ l'impact de l'administration d'une seule dose de STZ (par injection IP) à la dose de 150 mg/kg et de 200 mg/kg.

A) Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 150 mg/kg sur des souris C57Bl/6NrJ

Evolution du taux de glycémie suite à l'administration de STZ₁₅₀

Pour cette seconde souche de souris C57Bl/6NrJ, 48h après l'injection d'une dose unique de STZ₁₅₀, une augmentation du taux de glycémie est observée pour le groupe traité STZ₁₅₀ rapport au groupe contrôle ($Gly_{t0-STZ150} = 148,5 \pm 16,9$ mg/dL, $Gly_{2j-STZ150} = 237,7 \pm 59,2$ mg/dL, $Gly_{2j-ctl} = 147,3 \pm 16,2$ mg/dL). Cette augmentation s'est poursuivie jusqu'à 2 semaines post-injection et est restée stable sur les 8 semaines de suivi atteignant la limite du lecteur de glycémie (>500 mg/dL). Une seule des souris traitées n'a pas atteint le seuil hyperglycémie pathologique (*cf.* Figure 4 panel A).

Evolution du poids corporel suite à l'administration de STZ₁₅₀

En comparaison avec le groupe d'animaux contrôle, les animaux traités avec STZ₁₅₀ présente une courbe de croissance identique. Aucune différence significative du poids corporel entre ces 2 groupes d'animaux n'a été observée à 8 semaines post-injection ($PC_{56j-STZ150} = 27,4 \pm 0,8$ g, $PC_{56j-ctl} = 28,8 \pm 1,2$ g) (*cf.* Figure 4 panel B).

Evolution de la vitesse de conduction neurale suite à l'administration de STZ₁₅₀

Les animaux traités avec STZ₁₅₀ présentent en moyenne une VCN qui reste identique sur les 6 semaines de suivi et sans différence significative comparativement aux animaux contrôles ($VCN_{42j-STZ150} = 23,5 \pm 3,0$ m/s, $VCN_{42j-ctl} = 24,3 \pm 0,4$ m/s). Cependant, à la 8^{ème} semaine, nous avons constaté une augmentation de la VCN chez le groupe d'animaux contrôle, qui n'est pas observée chez les animaux traités avec STZ₁₅₀ (tendance sans différence significative, test T, $p = 0,057$) (*cf.* Figure 4 panel C).

Conclusion protocole 2.1 STZ₁₅₀

A l'issue de ce protocole examinant sur cette seconde souche de souris C57Bl/6NrJ l'impact de l'administration d'une dose unique STZ₁₅₀, nous constatons qu'une hyperglycémie pathologique sévère a été induite durant les 8 semaines de suivi post-injection. Néanmoins, les autres paramètres physiologiques étudiés dans ce protocole -que sont le poids corporel (PC) et la vitesse de conduction du nerf caudal (VCN)- ne présentaient pas d'évolution différente comparativement au groupe d'animaux contrôle.

La STZ injectée sur des souris C57Bl/6NrJ à la dose de 150 mg/kg a permis d'induire une hyperglycémique pathologique mais sans expression clinique sur les autres paramètres physiologiques étudiés (poids corporel, vitesse de conduction neurale).

Il s'agit d'un nouveau tableau clinique totalement différents des précédents. Nous avons décrit avec la souche de souris C57Bl/6JrJ soit une hyperglycémie pathologique associée à des altérations des paramètres physiologiques (PC et VCN) avec une administration de STZ₂₀₀ ou une hyperglycémie à « bas-bruit » n'atteignant pas le seuil hyperglycémie pathologique (>300mg/dL) et sans modification notable des altérations des paramètres physiologiques (PC et VCN).

Avec cette seconde souche de souris C57Bl/6NrJ et l'administration de STZ₁₅₀ nous observons une hyperglycémie pathologique (>300mg/dL) sans signe clinique associé (perte de poids ou à une neuropathie périphérique).

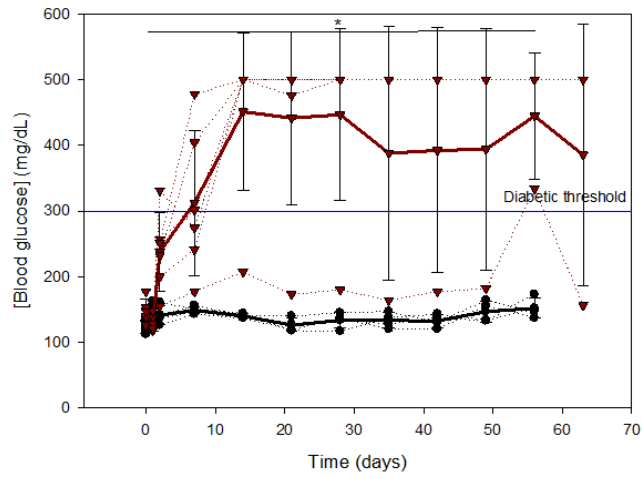
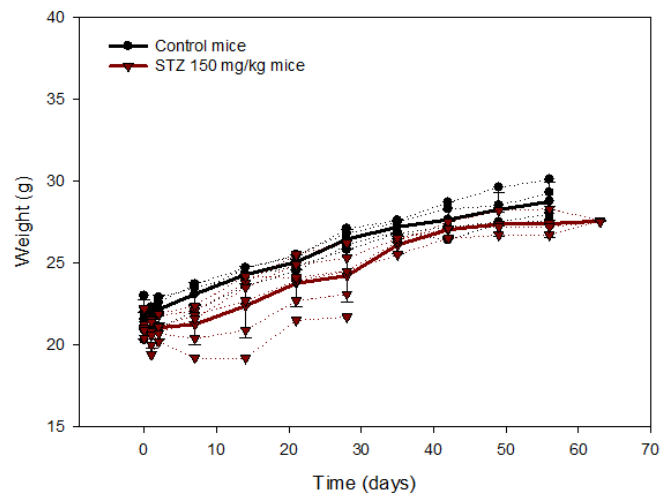
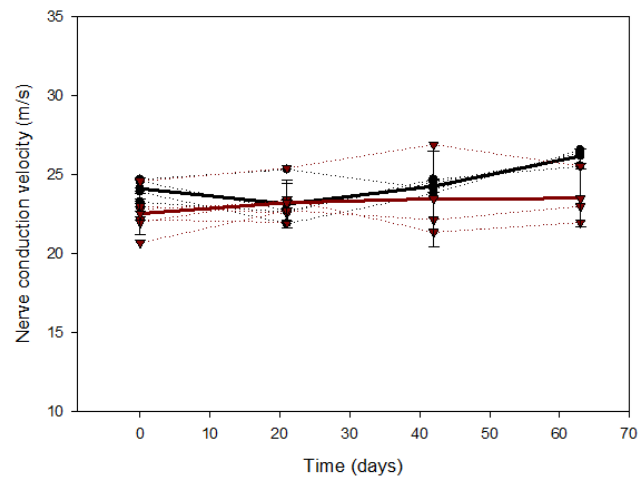
A**B****C**

Figure 7 : Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 150 mg/kg sur des souris C57Bl/6NrJ.

La mesure du taux de glycémie (panel A), du poids corporel (panel B) et de la vitesse de conduction nerveuse caudale (panel C) ont été réalisées pendant 8 semaines après l'administration par une injection unique d'une dose de streptozotocine à la dose de 150mg/kg. Les données moyennées (moyenne \pm écart type) et les données individuelles sont représentées.

T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test *P<0.05

Taille des groupes : souris contrôles (n=4), souris STZ 150 mg/kg (n=6)

B) Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris C57Bl/6NrJ

Evolution du taux de glycémie suite à l'administration de STZ₂₀₀

Tout comme pour les souris C57Bl/6NrJ traitées avec une dose unique de STZ₁₅₀ mg/kg, une augmentation significative du taux de glycémie a été observée pour le groupe traité STZ₂₀₀ 48h après l'injection. Toutes les souris injectées ont atteint le seuil hyperglycémie pathologique et même la limite du lecteur 48h après injection (Gly2j-STZ₁₅₀ = 472,5 ± 29,8 mg/dL, Gly2j-ctl = 147,3 ± 16,2 mg/dL) (*cf.* Figure 5 panel A).

Evolution du poids corporel suite à l'administration de STZ₂₀₀

Cette forte augmentation du taux de glycémie est associée avec une perte de poids corporel des souris traitées STZ₂₀₀ par rapport aux souris contrôles. Cette perte de poids corporel a été observée jusqu'à 3 semaines post-injection.

Après le point à 3 semaines post-injection, seule une souris traitée STZ₂₀₀ (sur un nombre initial de 12) a été suivie et nous avons constaté une reprise de poids corporel avec un courbe de croissance parallèle à celle des animaux contrôles (*cf.* Figure 5 panel B).

Evolution de la vitesse de conduction neurale suite à l'administration de STZ₂₀₀

Il n'a pas été possible de réaliser un suivi sur un période de 8 semaines une mesure de la vitesse de conduction neurale sur un groupe d'animaux traité STZ₂₀₀ qui présentait un état de bien-être qui s'est dégradé (*cf.* Figure 5 panel C). Ces animaux ont dû être sacrifiés dans le cadre du bien-être animal pour minimiser la souffrance engendrée (règle des 3R).

Conclusion protocole 2.2 STZ₂₀₀ sur les souris C57Bl/6NrJ

L'administration d'une dose STZ₂₀₀ a été très impactante sur l'état sanitaire et de bien-être des animaux traités. Selon les règles éthiques et afin de minimiser la souffrance engendrée, nous a été contraint de sacrifier ces animaux traités.

La STZ injectée sur des souris C57Bl/6NrJ à la dose de 200 mg/kg est toxique pour les animaux traités et ne permet pas de poursuivre les études à cette dose.

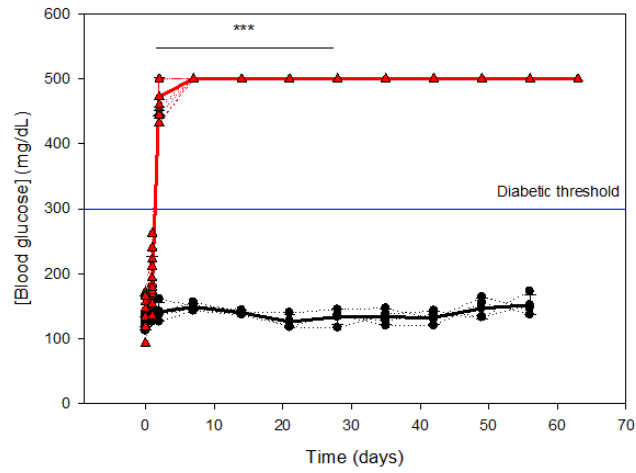
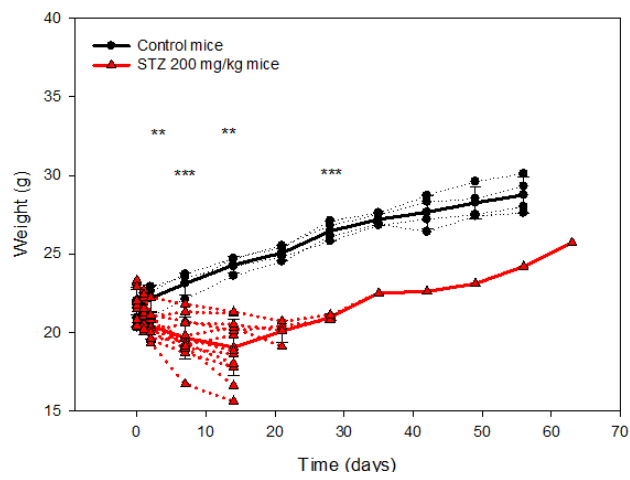
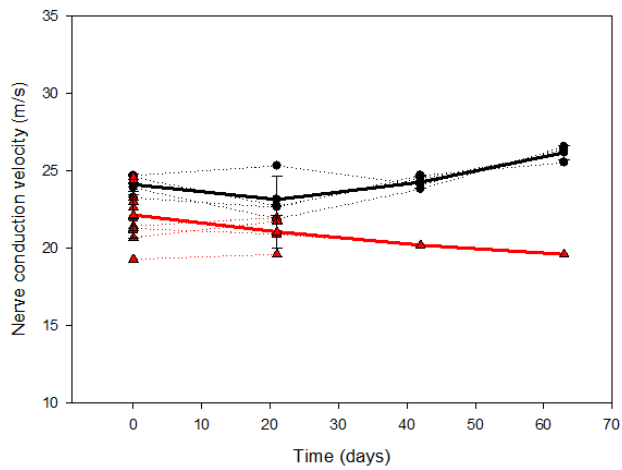
A**B****C**

Figure 8 : Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris C57Bl/6NrJ.

La mesure du taux de glycémie (panel A), du poids corporel (panel B) et de la vitesse de conduction nerveuse caudale (panel C) ont été réalisées pendant 8 semaines après l'administration par une injection unique d'une dose de streptozotocine à la dose de 150mg/kg. Les données moyennées (moyenne \pm écart type) et les données individuelles sont représentées.

T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test **P<0.01 ***P<0.001

Taille des groupes : souris contrôles (n=4), souris STZ 150 mg/kg (n=12).

Conclusion protocole n° 2 syndrome métabolique hyperglycémique sur la souche de souris C57Bl/6NrJ

L'objectif de ce protocole n° 2 était d'établir un modèle de syndrome métabolique hyperglycémique (SMH) sur la souche de souris C57Bl/6NrJ.

Si une dose unique de STZ₁₅₀ injectée en IP a induit une hyperglycémie sévère pathologique (>500mg/dL) et chronique, celle-ci n'est pas associée avec des altérations de la croissance de la courbe de poids corporel et des mesures électrophysiologiques, sur une période de suivi de 8 semaines.

D'autre part, la dose unique de STZ₂₀₀ injectée en IP est toxique et ne permet pas d'envisager de poursuivre les investigations.

Dans la suite de ce projet, nous ne continuerons pas à travailler avec cette souche de souris C57Bl/6NrJ. Il faut sans doute maintenir au-delà de 8 semaines les souris recevant une dose de STZ150 pour sans doute observer des modifications des marqueurs physiologiques étudiés (poids corporel, vitesse de conduction neurale) et peut-être des marqueurs physiologiques de la fonction auditive.

V) Protocole n°3 : Syndrome métabolique hyperglycémique sur la souche de souris CBA/JrJ

Dans la littérature scientifique, un nombre plus restreint d'études est disponible sur l'étude des conséquences de l'administration de STZ sur la souche de souris CBA/JrJ. Par exemple, et de façon étonnante, une seule étude a décrit la neuropathie douloureuse sur cette souche CBA/JrJ dans le cadre d'une hypoglycémie (Zhang et al., 2016).

Notre choix s'est porté sur de cette souche de souris CBA/JrJ, car comparativement à la souche de souris C57Bl/6JrJ qui présente des pertes auditives précoces liées à l'âge (dès 2-3 mois d'âge), elle présente une fonction auditive stable sur près 2 ans.

Et l'objectif de notre projet est d'étudier les conséquences de l'installation d'un SMH sur la fonction auditive tant sur la souche C57Bl/6JrJ que la souche CBA/JrJ.

A) Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 150 mg/kg sur des souris CBA/JrJ

Evolution du taux de glycémie suite à l'administration de STZ₁₅₀

Nous avons constitué un groupe contrôle de 6 souris mâles et un groupe de 10 souris mâles traitées STZ₁₅₀. Lors de l'administration de la STZ₁₅₀, toutes les souris étaient âgées de 6 semaines.

Suite à l'administration d'une dose unique STZ₁₅₀, le taux moyen de glycémie des animaux traités présente une augmentation lors de la mesure effectuée à 7 jours après administration de STZ₁₅₀ ($Gly_{t0-STZ150} = 165,0 \pm 20,8$ mg/dL; $Gly_{7j-STZ150} = 212,4 \pm 30,8$ mg/dL). Parmi les animaux traités STZ₁₅₀, 7 sur 10 présentent cette augmentation du taux de glycémie pour dépasser à 8 semaines (56 jours) de suivi après l'administration de STZ₁₅₀ le seuil hyperglycémie pathologique. Les 3 autres souris traitées STZ₁₅₀, présentent une hyperglycémie non pathologique par rapport aux animaux contrôles et ceci sur les 30 semaines de suivi (*cf.* Figure 6 panel A).

Evolution du poids corporel suite à l'administration de STZ₁₅₀

Durant les 30 semaines de suivi après l'administration de STZ₁₅₀, les 10 souris recevant de la STZ₁₅₀ ont montré en moyenne une prise de poids corporel similaire aux souris contrôles ($PC_{112j-STZ150} = 31,0 \pm 2,8$ g, $PC_{112j-ctl} = 31,0 \pm 2,0$ g) (*cf.* Figure 6 panel B).

Evolution de la vitesse de conduction neurale suite à l'administration de STZ₁₅₀

En moyenne, aucune différence pour la mesure de la vitesse de conduction neurale n'a été observée entre les 2 groupes durant les 30 semaines de suivi après l'administration de STZ₁₅₀ ($VCN_{112j-STZ150} = 24,9 \pm 2,5$ m/s, $VCN_{112j-ctl} = 25,7 \pm 1,2$ m/s) (*cf.* Figure 6 panel C).

Conclusion protocole 1.1 STZ₁₅₀ chez les souris CBA/JrJ

L'administration d'une dose unique STZ₁₅₀ sur la souris de souris CBA/JrJ montre l'installation d'une hyperglycémie pathologique 8 semaines après l'injection de STZ₁₅₀ mais sans modification des marqueurs physiologiques étudiés que sont la prise de poids ou de la vitesse de conduction du nerf caudal, au cours des 30 semaines de suivi des animaux. Néanmoins, l'induction de l'hyperglycémie pathologique n'est pas obtenue sur la totalité des animaux injectés STZ₁₅₀.

La STZ injectée sur des souris CBA/JrJ à la dose de 150 mg/kg n'a pas permis d'induire un syndrome métabolique hyperglycémique rapidement et de façon stable chez le groupe traité.

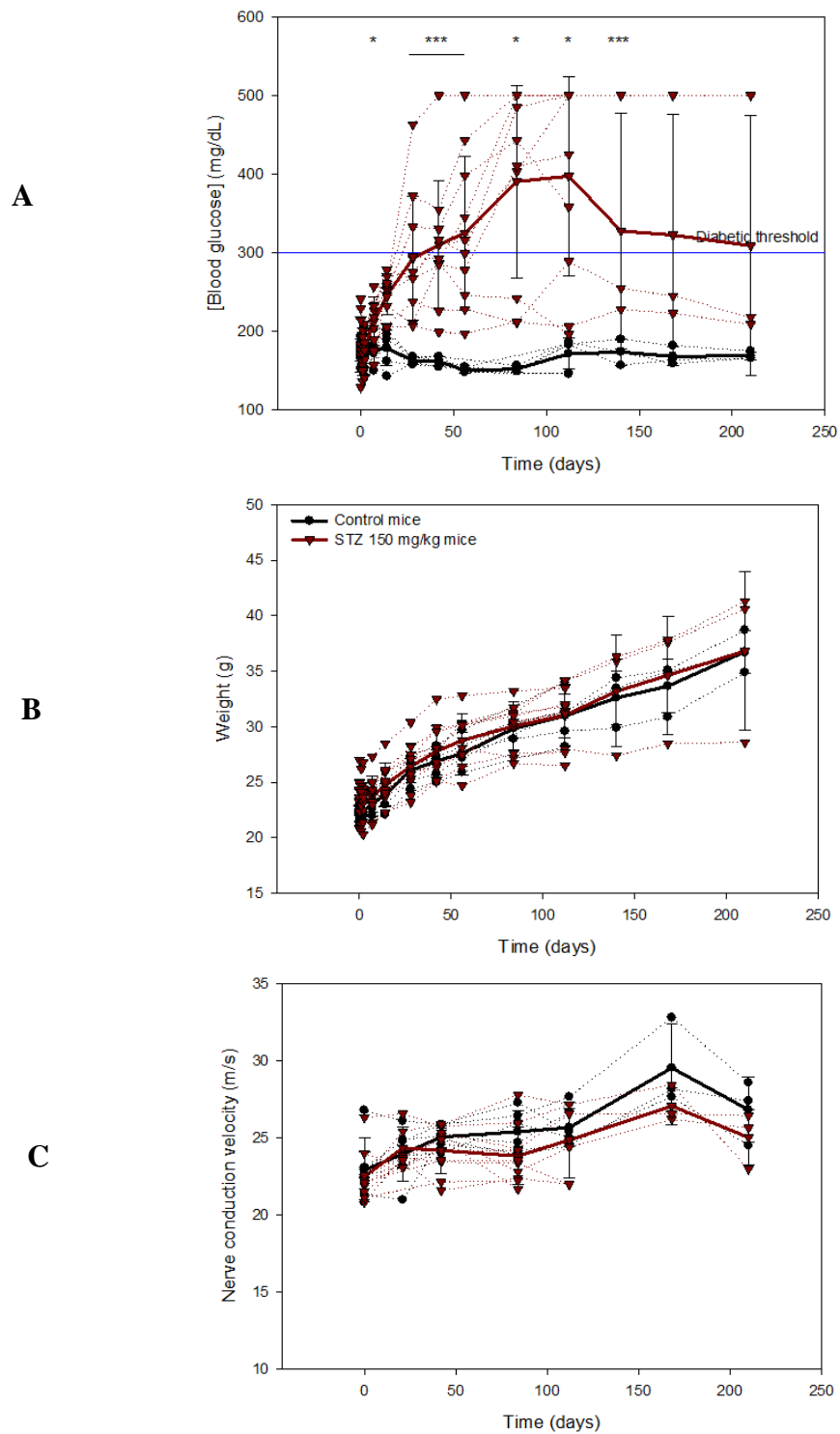


Figure 9 Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 150 mg/kg sur des souris CBA/JrJ.

La mesure du taux de glycémie (panel A), du poids corporel (panel B) et de la vitesse de conduction nerveuse caudale (panel C) ont été réalisées pendant 30 semaines après l'administration par une injection unique d'une dose de streptozotocine à la dose de 150mg/kg. Les données moyennées (moyenne \pm écart type) et les données individuelles sont représentées.

T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test *P<0.05 ***P<0.001.

Taille des groupes : souris contrôles (n=6), souris STZ 150 mg/kg (n=10).

B) Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris CBA/JrJ

Evolution du taux de glycémie suite à l'administration de STZ₂₀₀

Nous avons constitué un groupe contrôle de 6 souris mâles et un groupe de 8 souris mâles traitées STZ₂₀₀. Lors de l'administration de la STZ₂₀₀, toutes les souris étaient âgées de 6 semaines. Suite à l'administration d'une dose unique STZ₂₀₀, seulement la moitié des souris traitées STZ₂₀₀ (4/8) ont présentées une augmentation rapide du taux de glycémie et dépassant le seuil hyperglycémie pathologique au 7^{ème} jour après l'injection STZ₂₀₀. De façon étonnante, l'autre moitié de souris ont présentées une augmentation retardée et lente du taux de glycémie. Elles ont même dépassé le seuil hyperglycémie pathologique au 112^{ème} jour après l'injection STZ₂₀₀. Puis une baisse progressive du taux de glycémie a ensuite été observé sans jamais atteinte des valeurs normatives (*cf.* Figure 7 panel A).

Evolution du poids corporel suite à l'administration de STZ₂₀₀

Durant les 30 semaines de suivi après l'administration de STZ₂₀₀, en moyenne les courbes de croissance du poids corporel des groupes contrôles et traités STZ₂₀₀ se superposent. Toutefois, nous constatons que certaines souris (2/8) traitées STZ₂₀₀ -qui présentent un taux de glycémie pathologique- voient leur poids corporel subir une cassure 12 semaines après l'injection de STZ₂₀₀. (*cf.* Figure 7 panel B). Nous remarquons également que les souris traitées STZ₂₀₀ qui ont présenté ce rebond hyperglycémique pathologique transitoire présentent un poids corporel supérieur à la courbes moyenne de croissance des souris contrôles (*cf.* Figure 7 panel B).

Evolution de la vitesse de conduction neurale suite à l'administration de STZ₂₀₀

En moyenne, aucune différence pour la mesure de la vitesse de conduction neurale n'a été observée entre les 2 groupes durant les 12 premières semaines de suivi après l'administration de STZ₂₀₀. Mais par la suite, les souris traitées STZ₂₀₀ voient leur vitesse de conduction neurale rester stable comparativement à une augmentation observée chez les animaux contrôles (*cf.* Figure 7 panel C).

Conclusion protocole 1.1 STZ₂₀₀ chez les souris CBA/JrJ

L'administration d'une dose unique STZ₂₀₀ sur la souris de souris CBA/JrJ laisse apparaître une variabilité dans l'installation de l'hyperglycémie pathologique. Si cette hyperglycémie pathologique s'installe, elle apparaît très rapidement dans la semaine qui suit l'injection de STZ₂₀₀ et elle se maintient tout au long des 30 semaines de suivi des animaux.

Nous avons observé chez certaines souris traitées STZ₂₀₀ qui ont présenté un phénomène de rebond hyperglycémique pathologique transitoire qui ne se maintient pas mais qui est suivi d'une hyperglycémie non pathologique.

La STZ injectée sur des souris CBA/JrJ à la dose de 200 mg/kg ne permet pas d'induire un syndrome métabolique hyperglycémique chez l'ensemble des souris injectées

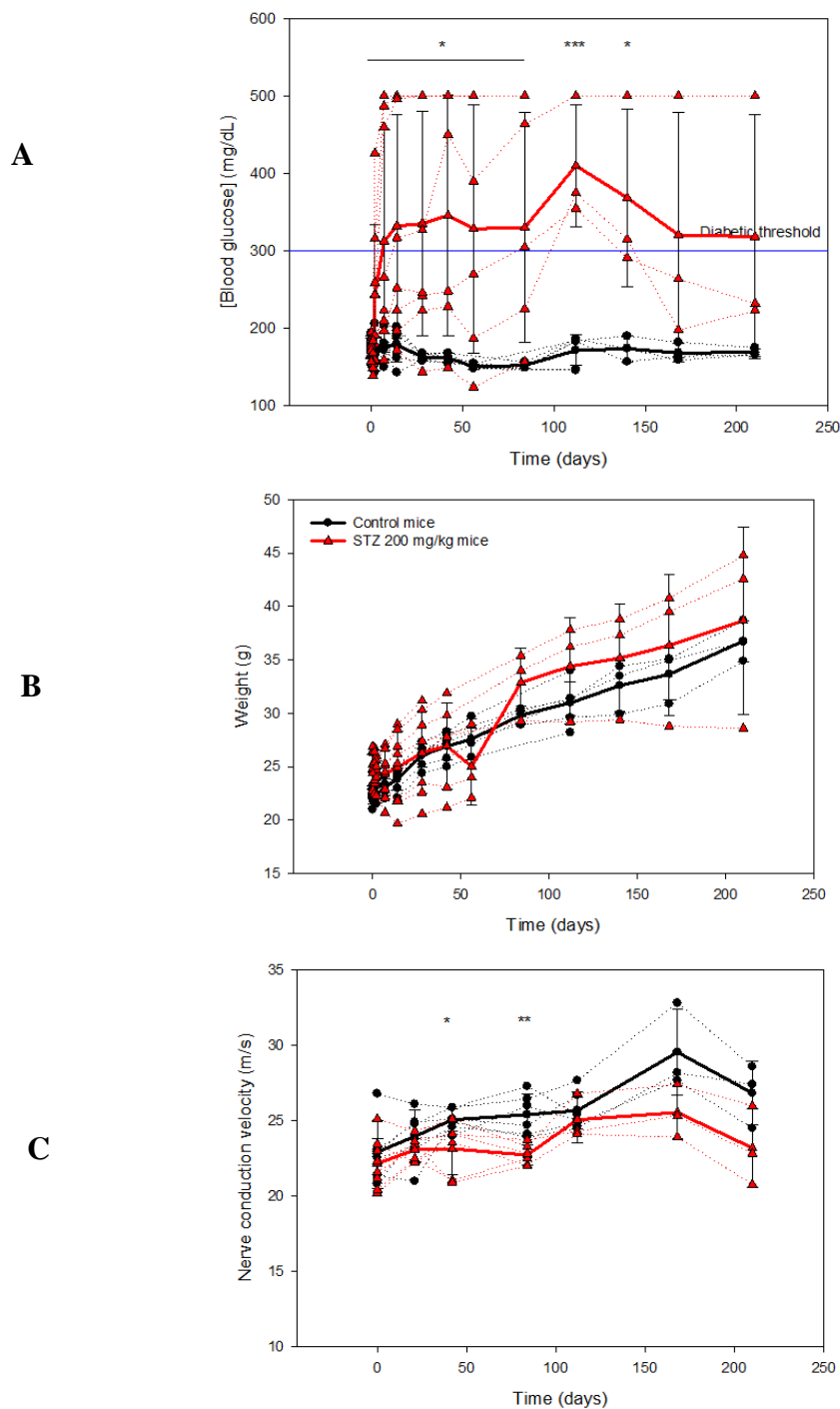


Figure 10 : Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris CBA/JrJ.

La mesure du taux de glycémie (panel A), du poids corporel (panel B) et de la vitesse de conduction nerveuse caudale (panel C) ont été réalisées pendant 30 semaines après l'administration par une injection unique d'une dose de streptozotocine à la dose de 200mg/kg. Les données moyennées (moyenne \pm écart type) et les données individuelles sont représentées T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$. Taille des groupes : souris contrôles (n=6), souris STZ 200 mg/kg (n=8).

C) Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 125 mg/kg sur des souris CBA/JrJ

Evolution du taux de glycémie suite à l'administration de STZ₁₂₅

Nous avons constitué un groupe contrôle de 6 souris mâles et un groupe de 8 souris mâles traitées STZ₁₂₅. Lors de l'administration de la STZ₁₂₅, toutes les souris étaient âgées de 6 semaines. Suite à l'administration d'une dose unique STZ₁₂₅, seulement une des souris traitées STZ₁₂₅ (1/8) a présenté une augmentation du taux de glycémie et dépassant le seuil hyperglycémie pathologique au 56^{ème} jour après l'injection STZ₁₂₅. Le reste des souris traitées a montré une hyperglycémie légèrement supérieure aux souris contrôles (Gly_{56j-STZ150} = 206,4 ± 51,5 mg/dL; Gly_{56j-STZ150} = 150,3 ± 4,0 mg/dL) (cf. Figure 8 panel A).

Evolution du poids corporel suite à l'administration de STZ₁₂₅

Durant les 16 semaines de suivi après l'administration de STZ₁₂₅, les 8 souris recevant de la STZ₁₂₅ ont montré en moyenne une augmentation de leur poids corporel par rapport aux souris contrôles (PC_{112j-STZ150} = 35,4 ± 3,4 g, PC_{112j-ctl} = 31,0 ± 2,0 g) (cf. Figure 8 panel B).

Evolution de la vitesse de conduction neurale suite à l'administration de STZ₁₂₅

En moyenne, aucune différence pour la mesure de la vitesse de conduction neurale n'a été observée entre les 2 groupes durant les 16 semaines de suivi après l'administration de STZ₁₂₅ (VCN_{84j-STZ125} = 26,4 ± 1,9 m/s, VCN_{84j-ctl} = 25,4 ± 1,4 m/s) (cf. Figure 8 panel C).

Conclusion protocole 3.3 STZ₁₂₅ chez les souris CBA/JrJ

L'administration d'une dose unique STZ₁₂₅ sur la souris de souris CBA/JrJ ne montre pas d'installation d'une hyperglycémie pathologique. Certaines souris présentant une modification de leur taux de glycémie voient leur poids corporel augmenter plus rapidement que les souris contrôles.

La STZ injectée sur des souris CBA/JrJ à la dose de 125 mg/kg n'a pas permis d'induire un syndrome métabolique hyperglycémique rapidement et de façon stable chez le groupe traité.

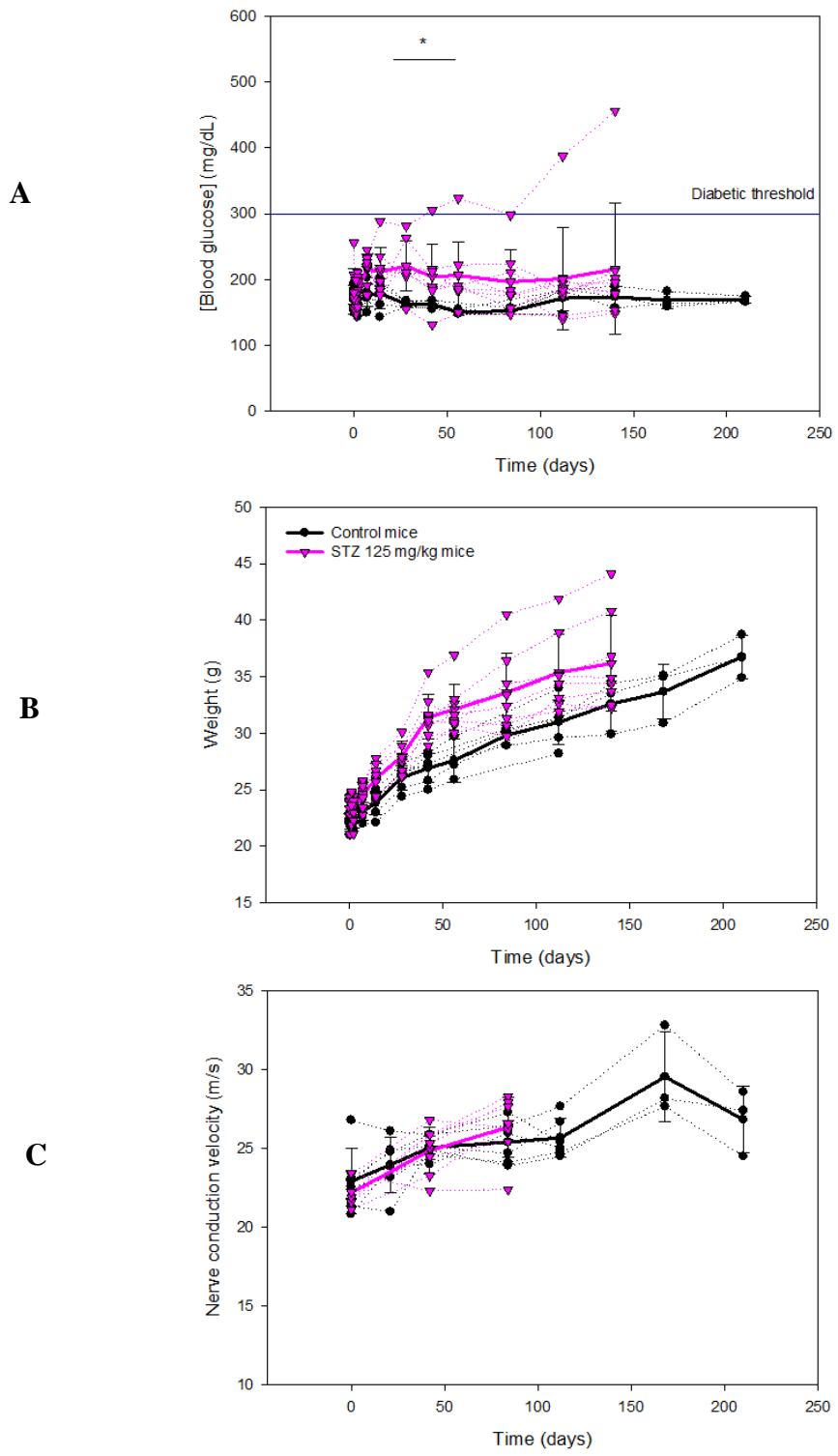


Figure 11 : Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 125 mg/kg sur des souris CBA/JrJ.

La mesure du taux de glycémie (panel A), du poids corporel (panel B) et de la vitesse de conduction nerveuse caudale (panel C) ont été réalisées pendant 30 semaines après l'administration par une injection unique d'une dose de streptozotocine à la dose de 125 mg/kg. Les données moyennées (moyenne \pm écart type) et les données individuelles sont représentées. T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test *P<0.05. Taille des groupes : souris contrôles (n=6), souris STZ 125 mg/kg (n=8).

Conclusion de l'étude 1 : Induction d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur des modèles murins

L'objectif de cette étude n°1 était d'induire -par une approche pharmacologique- un syndrome métabolique hyperglycémique à l'aide d'une injection de streptozotocine sur 3 souches de souris : C57Bl/6JrJ, C57/Bl6NrJ et CBA/JrJ.

Les premiers tests d'induction d'un SMH par injection d'une substance chimique, la streptozotocine (STZ), ont montré une grande variabilité selon la souche murine ou encore la dose de STZ administrée.

Les expérimentations menées sur la souche de souris C57/Bl6NrJ ne nous ont pas permis d'obtenir un SMH avec la dose de STZ₁₅₀. Seule l'hyperglycémie pathologie a été mesurée et elle n'est pas associée avec des altérations de la croissance de la courbe de poids corporel et des mesures électrophysiologiques, sur une période de suivi de 8 semaines. Nous avons décidé de ne pas poursuivre les investigations avec l'administration de STZ₂₀₀ sur cette souche C57/Bl6NrJ. EN effet, nous avons constaté que la STZ présentait une toxicité importante qui altérerait rapidement et profondément de l'état général des animaux traitées STZ₂₀₀.

Une de nos réflexions serait que la souche C57/Bl6NrJ présenterait une sensibilité plus marquée à la STZ illustrée par une hyperglycémie pathologie facilement induite et associée ou non à une dégradation de l'état général des animaux.

Concernant les deux souches C57Bl/6JrJ et CBA/JrJ, les expérimentations menées nous ont permis de valider que l'administration de STZ₂₀₀ induisait un SMH rapide, stable avec l'ensemble des altérations du taux de glycémie, du poids corporel et des vitesses de conduction.

Tout au long du suivi quotidien apporté aux animaux, nous avons établi un score de bien-être animal à l'aide de l'échelle de score de condition physique et adaptée à notre projet (Ullman-Culléré et Foltz, 1999).

L'état de santé global des animaux est très légèrement modifié mais reste tout à fait acceptable comparativement à celui des animaux contrôles (cf. résultats fiches). En aucun cas les animaux ayant reçu une dose de STZ₂₀₀ n'ont présent une dégradation de l'état de santé global, pouvant ainsi être associé à une souffrance engendrée par l'administration de la STZ₂₀₀. La réglementation en vigueur nous contraint à réduire ou à supprimer la souffrance animale et donc par conséquent en dernier recours à sacrifier les animaux et donc interrompre les expérimentations.

Au sujet de la souche CBA/JrJ, nous avons constaté que -dans une même série- les souris ayant reçu l'injection IP de STZ en dernier ne développaient pas de SMH contrairement aux premières souris injectées. Il y avait donc un effet temporel. Nous savions que la STZ était peu stable et son efficacité diminuait rapidement après sa mise en solution. Donc, dans la suite de nos travaux, nous avons revu notre procédure d'injection de la STZ en favorisant des lots avec un petit nombre d'animaux pour être sûr de la stabilité de la STZ et de son action diabétogène identique sur l'ensemble des souris de ce même lot.

Dans la prochaine étude n°2 nous souhaitons examiner si un SMH peut être associé ou non à des altérations de la fonction auditive. Et pour cela, nous conserverons le protocole avec une dose de STZ₂₀₀ pour les deux souches C57Bl/6JrJ et CBA/JrJ.

Discussion – Partie 1 Diabète

I) Avant-propos

A) Pourquoi le choix du terme « syndrome métabolique hyperglycémique » (SMH) à la place de « diabète »

Dans ce projet sur un modèle animal, les conséquences d'une maladie métabolique prévalente, le diabète, sont étudiées et plus particulièrement les effets possibles sur la fonction auditive.

Le diabète est une maladie humaine se développant à partir de plusieurs facteurs selon la pathogenèse associée (type 1, 2, 3 ou gestationnel). Cette pathologie est difficile à modéliser dans son entièreté avec tous les mécanismes physiopathologiques de l'état diabétique et ses complications liées (Pandey et Dvorakova, 2020).

Le modèle animal diabétique est ici utilisé car il n'existe pas de méthode *in vitro* ou *in silico* qui reproduise l'état multifactoriel complexe de l'apparition du diabète ou l'interaction avec un système immunitaire tel que retrouvé chez l'homme (Graham et Schuurman, 2015).

En fonction du résultat recherché, l'accent peut être mis sur les modèles qui imitent la manifestation des symptômes dans l'état clinique, les similitudes biologiques sous-jacentes, ou les deux (McGonigle et Ruggeri, 2014).

Les modèles de rongeurs du diabète de type 1 induit chimiquement sont couramment utilisés dans les études sur la prévention, les mécanismes immunologiques et la fonction métabolique de la pathologie humaine (O'Brien et al., 2014).

Dans ce projet, un modèle animal induit chimiquement a été mis en avant. Le modèle établi au cours de ce travail a été un modèle induit qui a conduit à une destruction des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Cette approche a permis de mimer une pathologie proche du diabète de type 1 en utilisant également des animaux jeunes (âgés de 6 semaines à l'induction).

Le modèle Streptozotocine (STZ) est le plus utilisé dans la littérature pour induire une pathologie diabétique. Ce modèle est plus communément utilisé pour des études de transplantation des cellules β pancréatiques ou de thérapie génique (Deeds et al., 2011). Ici, le modèle est utilisé pour son faible coût, la faisabilité sur un échantillon de grande taille et la

capacité de la STZ à détruire les cellules β pancréatiques causant une hyperglycémie. Le modèle murin de STZ a une valeur translationnelle modérée par rapport à la condition clinique.

D'autres modèles murins existent, comme le modèle spontané auto-immun (Non-Obese Diabetic mouse (NOD mouse)) ou le modèle induit génétiquement (AKITA ou db/db). Ces modèles sont aussi utilisés pour comprendre les mécanismes du diabète de type 1. Cependant, ils ont démontré des limites comme un coût plus élevé ou une induction variable de la maladie. (O'Brien et al., 2014 ; King 2012)

Les modèles, passant par des régimes alimentaires riches en graisses, se rapprochent du contexte clinique d'un diabète de type 2 mais ils ne sont pas réellement spontanés. En effet, une « contrainte » alimentaire non naturelle a été établie pour ces animaux.

Dans ce projet, le choix s'est porté d'induire une pathologie humaine chez différentes souches de souris à l'aide d'une substance chimique, la STZ. C'est pourquoi le terme de « syndrome métabolique hyperglycémique » (SMH) est utilisé car il paraît plus approprié à la situation étudiée que le terme « diabète ».

B) Pourquoi le choix du modèle murin

Le choix de faire cette recherche sur un modèle murin s'explique par le fait que c'est un modèle grandement étudié dans la littérature scientifique. Il a donc été possible de comparer nos résultats avec ceux publiés dans la littérature.

Le modèle murin est plus facilement manipulable, peu cher avec la possibilité d'étudier sur un échantillon de plus grande taille contrairement à d'autres modèles fréquemment utilisés dans la recherche sur le « diabète » ou sur la physiologie et les pathologies de la fonction auditive (rat, chinchilla, primates non humains). Également, le choix de ce modèle murin nous a permis de réduire la quantité de STZ utilisée donc de réduire le coût des consommables.

Des animaux mâles ont été utilisés pour ne pas introduire de biais expérimental lié à l'œstrus chez la femelle (Le May et al., 2006). Les rongeurs présentent une différence substantielle entre les sexes en ce qui concerne la sensibilité à la STZ. Les souris et les rats mâles ont tendance à être plus sensibles au « diabète » induit par la STZ (Deeds et al., 2011). Cette différence peut être significative, avec peu ou pas de sensibilité chez les souris femelles et une hyperglycémie sévère chez les souris mâles recevant des doses identiques (Kolb, 1987 ; Leiter, 1982). Les animaux mâles sont utilisés dans la très grande majorité des études réalisées dans notre unité de recherche, ce qui facilite la comparaison des données issues des diverses expérimentations

précédemment réalisées (Souchal et al., 2018 ; Petit et al., 2014 ; Rondon et al., 2010). Cependant, il aurait été également intéressant et pertinent d'utiliser des animaux femelles pour comparer les effets d'un SMH sur la fonction auditive.

Au sein du laboratoire, l'équipe possède une grande expertise dans l'utilisation de modèles murins dans l'étude de la fonction auditive. Les modèles de souris, ici utilisés, présentent une variabilité phénotypique de la fonction auditive. La souche C57Bl/6JrJ présente une dégradation de sa fonction auditive dès le 2^e mois de vie (Zheng et al., 1999). Elle est connue pour être le modèle de vieillissement précoce et de presbyacousie (surdité liée à l'âge). Dans ce projet, la souche C57Bl/6JrJ a   t  e choisie pour mesurer l'impact d'un SMH sur la fonction auditive. Ce modèle de souris présente une dégradation précoce spontanée de sa fonction auditive par rapport à un modèle ayant une fonction auditive stable dans le temps. Pour la comparaison avec un modèle ayant une fonction auditive stable dans le temps, le choix s'  st porté sur la souche CBA/JrJ. Cette souche est connue pour être robuste physiologiquement (contrairement à la souche C57Bl/6JrJ et    d'autres souches) et pour posséder une fonction auditive stable sur près de 2 ans (Ohlemiller et al., 2010 ; Spongr et al., 1997). L'équipe a également utilisée une autre souche dans ses recherches, la souche CD1. Cette souche n'a pas   t  e utilisée dans cette étude pour sa vulnérabilité à un vieillissement précoce de sa fonction auditive (d  ficiance avant 30 jours d'âge) (Souchal et al., 2018). Pour cette raison, nos travaux ne se sont concentrés que sur l'étude des souches C57Bl/6JrJ et CBA/JrJ.

C) Choix d'animaux « jeunes »

Pour cette étude, l'utilisation d'animaux « jeunes » a   t  e choisie pour plusieurs raisons. La plupart des personnes diabétiques diagnostiquées (près de 90%) sont atteintes du diabète de type 2. Le diabète de type 2 a comme principal facteur d'incidence l'âge. C'  st une pathologie qui survient à un âge avancé pour la plupart des personnes atteintes. Afin de montrer l'effet d'un diabète sur la fonction auditive, le facteur de l'âge a   t  e exclu du projet en utilisant des animaux jeunes. La souche C57Bl/6JrJ est un modèle animal de vieillissement précoce dès le 2^e mois d'âge, en particulier de la fonction auditive avec la délétion du gène *Ahl*. A partir du 6^e mois, cette souche est atteinte d'une perte auditive neurosensorielle sévère sur les hautes fréquences (Walton et al., 2008). Pour réduire le biais de ce facteur de vieillissement précoce liée à l'âge et obtenir des valeurs viables, l'âge des animaux s'  st porté avec une induction d'un SMH à 6 semaines d'âge. Avec toutes les réserves possibles, ceci nous conduit à avoir un modèle plus proche d'un diabète de type 1 que d'un diabète de type 2 sachant que le diabète de type 1 se

déclenche principalement à l'âge enfant/adolescent. Cependant il serait intéressant de faire des études sur des animaux plus âgés pour mimer un modèle plus proche d'un diabète de type 2. Mais les résultats qui pourraient être recueillis sur la souche C57Bl/6JrJ seraient à prendre avec la plus grande précaution de par le fait de la perte auditive neurosensorielle précoce se produisant avec ce modèle. Pour comparer par rapport à l'utilisation d'animaux jeunes pour la souche C57Bl/6JrJ, il est logique d'utiliser également des souris jeunes de souche CBA/JrJ.

D) Choix de la STZ

Pour induire un modèle « diabétique » ou de SMH, la STZ a été utilisé. Cette substance chimique est la plus communément utilisée pour induire un modèle animal diabétique (Kottaisamy et al., 2021). L'utilisation de la STZ est reconnue comme étant une substance diabétogène qui détruit sélectivement les cellules β des cellules pancréatiques (Rakieten et al., 1963). La STZ est également une substance cytotoxique analogue au glucose comme l'alloxane.

La STZ a été préféré à l'alloxane pour sa meilleure capacité à provoquer une hyperglycémie insulino-déficiente sans induire de symptômes cachexiques aigus ou la mort des animaux traités (Jolival et al., 2016 ; Mansford and Opie, 1968). La STZ doit tout de même être manipulé avec précaution. Elle reste une substance toxique pour l'homme et son utilisation en expérimentation se fait dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire. Cette substance reste tout de même controversée pour induire un « diabète » en voulant comparer avec les mécanismes pathophysiologiques se passant chez l'homme.

Comme précédemment dit, des modèles génétiquement induits existent (souris AKITA, souris db/db). Cependant, leur utilisation nécessite un coût plus important que la STZ ainsi qu'une contrainte liée à l'environnement de travail. Ces souris génétiques doivent être hébergés dans une animalerie avec un environnement spécifique : une zone EOPS (Exempt d'organisme pathogène spécifique). Au sein de notre établissement, dans cette zone, il n'existe pas de pièce d'expérimentation pour effectuer des explorations auditives. Il aurait été donc nécessaire de sortir les animaux de cette zone pour réaliser les tests puis les réintroduire dans la zone EOPS. Selon les règles en vigueur dans les environnements EOPS, c'est incompatible de le réaliser.

Pour le modèle d'induction de diabète spontané auto-immun (souris NOD), leur utilisation nécessite un coût élevé par rapport à l'utilisation de STZ ainsi une disponibilité absente en France auprès des fournisseurs d'animaux de laboratoire.

Pour la modélisation d'un syndrome s'approchant d'un diabète de type 2, l'induction par un régime alimentaire riche en graisses a été envisagé. Cependant, cette induction aurait été longue dans le temps (au minimum 6 mois d'expérimentation) et incompatible avec la contrainte d'une évaluation auditive sur le modèle murin C57Bl/6JrJ.

Pour ces raisons, l'induction d'un diabète ou d'un SMH a été privilégié par l'injection de STZ qui a permis d'induire des symptômes retrouvés chez les patients diabétiques (hyperglycémie, perte de poids, neuropathie périphérique) rapidement pour effectuer une évaluation de la fonction auditive.

II) Discussion étude 1 Induction d'un SMH

Dans la littérature scientifique, les études utilisant la STZ sur des modèles murins pour induire « un diabète » (selon les auteurs), se focalisent principalement à un suivi du taux de glycémie et une surveillance du poids corporel comme facteurs de contrôle de mise en place du diabète (Furman et al., 2021 ; Jolivalt et al., 2016).

a) Hyperglycémie liée à l'injection de STZ

La mesure du taux de glycémie est le test communément utilisé pour diagnostiquer un diabète. Dans un diabète de type 1, l'augmentation du taux de sucre est due à la destruction des cellules β pancréatiques qui produisent l'insuline. La perte de production d'insuline provoque une dérégulation du sucre dans le sang induisant ainsi son augmentation. Dans notre étude, la STZ détruit les cellules β pancréatiques à travers les transporteurs GLUT-2. Selon nos souches utilisées (C57Bl/6JrJ, C57Bl/6NrJ, CBA/JrJ), une grande variabilité de réponses du taux de glycémie a été mesurée selon la dose de STZ injectée. Pour avoir la meilleure efficacité de la STZ, certaines études ont montré que les animaux devaient être mis à jeun la nuit précédant l'injection (Jolivalt et al., 2016). Une réduction des réserves glucidiques circulant pendant le jeûne permet d'augmenter l'absorption de la STZ dans les cellules β pancréatiques à travers les transporteurs GLUT-2 et d'augmenter les chances de réussite de l'induction du diabète.

Dans notre protocole, les animaux ont été mis à jeun seulement 6 heures avant l'injection de la STZ. Les souris étant des animaux crépusculaires, la phase diurne a été privilégié pour la

mise à jeun, ce qui correspond à leur phase de repos. Cette phase de repos correspond à ce qui est préconisé chez l'homme (mise à jeun la nuit durant la phase de repos) avant un examen médical nécessitant un jeûne au préalable. La variabilité des réponses observées dans notre étude pourrait être expliquée par la capacité de certains animaux à conserver des réserves glucidiques après ce jeûne.

Jolival et al., 2016 ont montré qu'une unique dose de 180-200 mg/kg de STZ pouvait provoquer la mort de 10 à 50% de leur échantillon (1 semaine après l'injection de STZ). Le reste de leur échantillon a montré une insulino-pénie marquée accompagné d'une perte de poids conséquente et d'un décès prématuré si de l'insuline exogène ne leur était pas injectée.

Au début de notre protocole, afin d'éviter un décès prématuré à nos animaux suite à l'administration de STZ, la dose de 150 mg/kg de STZ (STZ₁₅₀) a été préférée pour tenter d'induire un SMH. A cette dose, pour les 3 souches murines étudiées (C57Bl/6JrJ, C57Bl/6NrJ et CBA/JrJ), aucune mort prématurée n'a été constatée. Pour la souche C57Bl/6JrJ, à une dose injectée de STZ₁₅₀, seulement 20% des souris ont exprimé une hyperglycémie sévère atteignant le seuil diabétique durant les 8 semaines d'expérimentation. Plus de 80% des souris C57Bl/6NrJ injectées ont atteint le seuil diabétique. Pour la souche CBA/JrJ, 50% des souris ont présenté une hyperglycémie sévère atteignant le seuil diabétique. Cette faible efficacité de cette dose à 150 mg/kg à induire un SMH peut être due pour plusieurs raisons. La première pourrait être la préparation de la STZ. En effet, la STZ mise en solution a une durée de vie très courte et doit être injectée rapidement. La seconde pourrait être la capacité des réserves glucidiques des animaux encore conséquentes et cette dose de STZ de 150 mg/kg n'est pas suffisante pour détruire les cellules β du pancréas. Les erreurs d'injection (en intravesical ou intramusculaire, non en intrapéritonéal) de l'expérimentateur pourraient être également une des raisons de l'échec de l'induction d'un SMH.

Suite à ces résultats décevants, la dose de 200 mg/kg de STZ a été utilisée pour induire un SMH comme retrouvé dans la littérature scientifique (Furman 2021 ; Fujita et al., 2012 ; Vasilyeva et al., 2009).

Pour la souche C57Bl/6JrJ, à une dose injectée de STZ₂₀₀, 90% des souris ont eu une hyperglycémie sévère sans pour autant entraîner leur décès prématuré durant les 8 semaines d'expérimentation. Pour la souche CBA/JrJ, à cette même dose, seulement 50% des souris ont présenté une hyperglycémie sévère sans non plus entraîner une mort prématurée durant les 8 semaines d'expérimentation. Cette souche CBA/JrJ étant considérée comme plus résistante

métaboliquement que la souche C57Bl/6JrJ, il est tout à fait possible que pour la souche CBA/JrJ, un jeûne de 6 heures n'ait pas été suffisant pour réduire drastiquement leurs réserves glucidiques au moment de l'injection de la STZ et induire une hyperglycémie sévère.

Pour la souche C57Bl/6NrJ, 3 semaines après l'injection, près de 92% des souris injectées ont dû être sacrifiées du fait d'une dégradation prononcée de leur état général. Ces animaux avaient développé une hyperglycémie sévère 48h après l'injection de STZ.

Les animaux de 2 souches (C57Bl/6JrJ et CBA/JrJ) ont développé une hyperglycémie sévère (taux de glycémie >500 mg/dL) de manière plus efficace à une dose injectée de STZ à 200 mg/kg qu'à 150 mg/kg. La dose de STZ 150 mg/kg a été plus efficace pour la souche C57Bl/6NrJ. Pour modéliser efficacement un SMH, la dose de STZ à 200 mg/kg a été la plus adaptée comme cela a été décrit dans la littérature.

b) Perte de poids corporel liée à l'injection de STZ

La surveillance du poids corporel est un marqueur très utilisé dans les études qui induisent un « diabète de type 2 » avec un régime alimentaire spécifique enrichi en graisses. Ce paramètre est également utilisé pour étudier les effets de l'induction d'un diabète de type 1. En effet, la perte ou la non-prise de poids corporel est un des symptômes les plus marqués après l'induction d'un diabète de type 1 en utilisant une très haute dose (200 mg/kg) de STZ (Furman et al., 2021). Dans notre étude et dans la littérature, la sévérité du SMH dépendait beaucoup du poids initial des animaux injectés. La perte de poids après l'induction du diabète était moins importante chez les animaux les plus lourds (Dekel et al., 2009). Cette mesure du poids corporel est également très importante dans la réglementation de l'expérimentation animale (règle des 3R). En effet, dès la conception d'une étude il est obligatoire d'établir un seuil de poids corporel minimal ou une perte de poids corporel (20% du poids corporel initial dans notre travail) à ne pas atteindre, sinon ceci conduit à la mise en place de procédure de sacrifice. La perte de poids corporel est un point limite important de l'échelle de bien-être et est indirectement un reflet du mal-être animal.

Dans notre étude et dans la littérature, le suivi du poids corporel est associé à la mesure du taux de glycémie comme facteurs principaux pour construire notre modèle murin « diabétique ». En effet, les études modélisant un « diabète de type 1 » avec une unique injection de STZ à haute dose (200 mg/kg) ont montré le lien entre une hyperglycémie sévère et une perte de poids corporel que ce soit sur la souche C57Bl/6J (Fujita et al., 2012) ou sur la

souche CBA/J (Vasilyeva et al., 2009). Un modèle murin utilisant une dose de STZ de 150 mg/kg a également été utilisé pour montrer le lien entre une hyperglycémie sévère et une croissance de prise de poids cassée par rapport au groupe contrôle (Hong et Kang 2008).

Dans notre cas, les groupes d'animaux utilisant les doses de STZ de 125 mg/kg et de 150 mg/kg ont montré une croissance de leurs poids corporels similaire aux animaux contrôles. Cela confirme que lorsque les animaux n'atteignent pas une hyperglycémie sévère (>300 mg/dL), leurs poids corporels ne diffèrent pas par rapport aux contrôles. Pour ces 2 doses, un SMH n'a pas été induit sur nos 3 souches de souris utilisées (C57Bl/6JrJ, C57Bl/6NrJ, CBA/JrJ).

Notre modèle utilisant une forte dose unique de STZ (200 mg/kg) a démontré, pour les souches C57Bl/6JrJ et C57Bl/6NrJ, qu'une hyperglycémie sévère était liée à une non-prise de poids corporels des animaux injectés. Pour la souche CBA/JrJ, les résultats sont très discutés selon nos études réalisées. Dans l'étude n°1, les souris CBA/JrJ injectées avec la STZ₂₀₀ ont eu une courbe de prise de poids corporel similaire aux souris contrôles. Ce résultat n'est pas si surprenant avec la variabilité de réponses de ces souris observées sur l'analyse du taux de glycémie. Les animaux ayant une hyperglycémie sévère (4 souris sur 8 injectées) ont montré une non-prise de poids alors que les souris n'atteignant pas le seuil « diabétique » ont eu une prise de poids supérieure aux souris contrôles. Ces résultats ont montré une tendance à induire un syndrome d'un « diabète de type 1 » mais la grande variabilité inter-individuelle n'a pas permis de l'affirmer complètement. Cependant, notre étude n°2 a permis de l'affirmer. Les souris injectées avec de la STZ₂₀₀ dans cette étude ont eu une non-prise de poids significative par rapport aux souris contrôles, induite en même temps que l'hyperglycémie sévère observée. Les résultats de l'étude n°2 ont permis de conclure d'un SMH a bien été induit sur notre modèle de STZ à haute dose chez nos 3 souches de souris utilisées confirmant ce qui a été décrit dans la littérature.

c) Perte de la conduction nerveuse caudale liée au statut diabétique

La mesure de la vitesse de conduction nerveuse est un test électrophysiologique permettant d'étudier l'apparition et la progression d'une neuropathie périphérique induite par les conséquences d'un diabète. Cette mesure est fréquemment utilisée pour valider un modèle animal diabétique de type 1 ou de type 2 (O'Brien et al., 2014). En effet, la neuropathie périphérique, étant une des complications les plus communes du diabète, est assez facilement évaluable par ce test simple et peu invasif pour les animaux. La neuropathie périphérique

diabétique se caractérise par une perte de sensibilité dans les extrémités, où les axones les plus longs des membres inférieurs sont touchés en premier (pied diabétique), suivis par les membres supérieurs (mains). La perte de sensibilité progresse de manière distale à proximale.

Chez la souris, la neuropathie périphérique est évaluée sur un nerf périphérique long et accessible sans nécessité de chirurgie, c'est-à-dire sur le nerf caudal de la queue. La mesure de la conduction nerveuse est représentée sous forme d'ondes correspondant aux fibres nerveuses stimulées. Les fibres nerveuses stimulées correspondent aux fibres A β myélinisées de grand diamètre qui sont associées aux mécanorécepteurs cutanés (Murakami et al., 2012). La mesure de la VCN peut également être le reflet des atteintes de la myéline produit sur un modèle de leucodystrophie (Petit et al., 2014).

Sur notre étude d'induction d'un SMH, aucune atteinte nerveuse n'a été observée sur nos 3 modèles murins (C57Bl/6JrJ, C57Bl/6NrJ, CBA/JrJ) suite à une injection de STZ à une dose de 125 ou 150 mg/kg et ce jusqu'à 8 semaines après l'injection. Sans l'atteinte du seuil d'une hyperglycémie sévère associée à une prise de poids constante sur 8 semaines, aucune neuropathie n'est apparue. Ces doses sont insuffisantes pour induire un SMH associée à une neuropathie périphérique.

Pour notre modèle de STZ à 200 mg/kg, une neuropathie périphérique est apparue, montrée par la diminution de la conduction nerveuse caudale sur 2 de nos modèles murins (C57Bl/6JrJ et C57Bl/6NrJ) à partir de 3 semaines après l'injection de STZ et jusqu'à la fin du suivi (8 semaines post-injection). Cette atteinte nerveuse est marquée après 8 semaines post-induction associée à une hyperglycémie sévère (>500 mg/dL) et un poids corporel n'évoluant pas sur cette durée.

Les résultats obtenus sur la souche CBA/JrJ sont contrastés. Sur notre étude n°1, une tendance à une atteinte nerveuse est observée à partir de la 6^e jusqu'à la 12^e semaine post-injection. Cette tendance est liée à une hyperglycémie sévère avec atteinte du seuil diabétique établi dans la littérature et une courbe de poids similaire aux souris contrôles. Cette observation est similaire à ce qui a été montré chez les 2 autres souches utilisées à part pour la courbe de poids. Sur cette souche CBA/JrJ, les expérimentations ont été menés jusqu'à 30 semaines après injection. Il est important de signaler qu'entre la 12^e et la 30^e semaine post induction, l'atteinte nerveuse observée n'était plus significative avec une conduction nerveuse qui ne diminuait plus. Ce constat peut être expliqué par le faible nombre de l'échantillon pour les 2 groupes (n=3) mais aussi par le fait que, dans ce groupe STZ₂₀₀, 2 des 3 souris évaluées voient également leurs

taux de glycémie diminué après 16 semaines post-injection. Cette diminution n'a pas de réelle explication étant donné que rien n'a été donné à ces animaux durant la durée des expérimentations.

Les résultats obtenus sur notre étude n°1 ne sont pas tout à fait en adéquation avec ceux obtenus sur notre étude n°2 portant sur l'étude de l'impact d'un SMH sur la fonction auditive périphérique. Pour la souche C57Bl/6JrJ, l'atteinte nerveuse est similaire à ce qui a été montré dans l'étude n°1 et ceci jusqu'à 12 semaines post-injection. Pour la souche CBA/JrJ, l'atteinte nerveuse est plus marquée avec une diminution de la vitesse de conduction du nerf caudal commençant 6 semaines après l'induction et très marquée après 12 semaines post-injection. Cette différence notable par rapport à l'étude n°1 est visible également avec une hyperglycémie sévère et une non-prise de poids corporel très accentué pour ce groupe de souris injecté avec 200 mg/kg de STZ.

Cette mesure de la vitesse de conduction nerveuse est un bon marqueur de l'installation d'un SMH ou « diabète » et des conséquences possibles de l'hyperglycémie. Notre modèle établi avec la dose de 200 mg/kg a bien engendré une neuropathie périphérique comme conséquence d'un SMH avec une apparition quelques semaines après la mise en place d'une hyperglycémie sévère et précoce. Il est à noter que la neuropathie périphérique est apparue avec un temps de latence supplémentaire pour la souche CBA/JrJ par rapport à la souche C57Bl/6JrJ en adéquation avec le temps de latence pour atteindre le seuil hyperglycémique « diabétique » entre ces 2 souches. Par ailleurs, nous avons constaté que chez les souris contrôles CBA/JrJ et C57Bl/6JrJ les VCN mesurées sur les 2 souches de souris étaient similaires (aux alentours de 25m/s).

Notre modèle de STZ à une seule forte dose (200 mg/kg) présente un phénotype neuropathique robuste et précoce. Des modifications de la fonction neuropathique, telles que la diminution de la vitesse de conduction nerveuse caudale, ont été observées surtout après 12 semaines post-injection de STZ comme cela avait déjà été montré confirmant notre modèle (O'Brien et al., 2014 ; Lupachyk et al., 2013 ; Obrosova et al., 2005). Ces études ont été réalisées chez la souche C57Bl/6, notre étude est une des rares à montrer ce phénotype neuropathique périphérique sur la souche CBA/J.

d) Autres paramètres de caractérisation du SMH non étudiés

a) Marqueurs sanguins

Dans certaines études, les auteurs examinent des marqueurs sanguins comme la tolérance à l'insuline ou la mesure de l'hémoglobine glyquée (test biochimique). Ces tests de ces marqueurs sanguins sont utilisés chez l'être humain pour diagnostiquer ou pour suivre l'évolution du diabète. Ces 2 marqueurs permettent de confirmer l'induction d'un diabète en plus de la mesure du taux de glycémie (Lee et al., 2020 ; Sullivan et al., 2007). Dans notre étude, ces 2 mesures de ces marqueurs sanguins n'ont pas été réalisés par un souci de coût du matériel non disponible dans le laboratoire. Également, une quantité plus importante de sang est nécessaire pour effectuer ces tests biochimiques. Cela était donc incompatible avec un suivi hebdomadaire comme la mesure du taux de glycémie que nous avons souhaité mettre dans nos protocoles. Cette ponction de sang plus importante aurait nui au bien-être des animaux et engendré un stress supplémentaire non nécessaire et serait donc venu en contre-courant à la réglementation éthique.

En clinique, une des complications liées au diabète est l'acidocétose. L'acidocétose est un syndrome métabolique qui se caractérise par une augmentation de la concentration de corps cétoniques dans l'organisme ou hypercétonémie. Les corps cétoniques constituent une source d'énergie alternative pour le cerveau lorsque le glucose devient insuffisant dans le sang. Cette augmentation provoque une acidité excessive du sang. L'acidocétose est associée à une mortalité importante.

Chez la personne diabétique, une acidocétose s'observe lorsque la quantité d'insuline dans le sang est insuffisante pour répondre aux besoins métaboliques du corps. Elle est donc liée à une hyperglycémie. L'acidocétose diabétique est surtout observée chez les diabétiques de type 1 et est moins fréquente chez les diabétiques de type 2. L'hyperglycémie, en provoquant une diurèse osmotique avec une perte importante de liquide et d'électrolyte, induit une acidité du sang qui s'observe par la mesure de la concentration des corps cétoniques (hypercétonémie). Le traitement associé comporte essentiellement une réhydratation couplée à l'administration d'insuline (Kanikarla-Marie et Jain 2016 ; Sassa et al., 2008).

Pour notre modèle chimiquement induit de souris diabétique, des études ont démontré que le diabète induit par une dose de STZ provoque une hyperglycémie associée à une hypercétonémie pouvant finir par une acidocétose (Chen et al., 2022 ; Graham et Schuurman

2015). Au début de notre étude, un suivi de la cétonémie sur des groupes de souris STZ à différentes doses a été réalisé. Les données ne sont pas montrées dans ce manuscrit mais aucune modification de la cétonémie n'a été observé jusqu'à 8 semaines après injection pour toutes les souches étudiées montrant une hyperglycémie sévère à n'importe quelle dose utilisée. Cette mesure n'a pas été conservé pour la suite de l'étude par souci du bien-être animal. En effet, pour la mesure de la cétonémie, une autre bandelette réactive était nécessaire. Ceci nécessitait une goutte de sang supplémentaire et plus importante en volume ce qui incommodait les animaux.

b) Troubles comportementaux

Une des principales complications associées au diabète est la neuropathie. La neuropathie diabétique est retrouvée dans au moins 50% des cas (Feldman et al., 2019 ; Sullivan et al., 2007). La neuropathie diabétique se caractérise principalement par une perte de la fonction sensorielle qui commence au niveau des extrémités inférieures. Plusieurs formes de neuropathie existent chez les patients diabétiques qui se manifestent sous différents signes cliniques comme la plus commune, la polyneuropathie symétrique distale (Callaghan et al., 2015). Un des symptômes associés à ces complications est la douleur ou neuropathie diabétique douloureuse.

i. Allodynie

La douleur neuropathique se caractérise par une douleur spontanée, des altérations de la perception de la douleur, une sensibilité accrue aux stimuli nocifs (hyperalgésie) et une sensibilité anormale à des stimuli auparavant non douloureux (allodynie). La douleur neuropathique diabétique est aussi décrite sur des modèles animaux diabétiques en particulier ceux utilisant la STZ (Jolivald et al., 2016 ; Lee-Kubli et al., 2014 ; Rondon et al., 2010).

Pour étudier la douleur neuropathique, différentes méthodes existent. Pour décrire une allodynie chez les animaux, le test par les filaments de Von Frey est le plus indiqué. Pour ce faire, des filaments de Von Frey avec des forces de flexion calibrées sont utilisés pour délivrer des stimuli mécaniques ponctuels d'intensité variable. En commençant par la force de filament la plus faible, des filaments de von Frey sont appliqués sous la voûte plantaire de la patte arrière des animaux avec une force suffisante pour provoquer une légère flexion contre la patte. Le seuil de retrait de la patte a été défini comme la pression minimale requise pour provoquer un réflexe de retrait de la patte. L'allodynie mécanique a été définie comme une diminution

significative des seuils de retrait à l'application du filament de von Frey (Jolival et al., 2016). Dans la littérature, il a été montré que des animaux diabétiques pouvaient développer une sensibilité accrue à une série de filaments de von Frey dans les 4 à 12 semaines suivant l'induction du diabète (Castañeda-Corral et al., 2021 ; Calcutt et al., 1996).

ii. Hyperalgésie

La douleur peut également s'exprimer par une sensibilité accrue aux stimuli nocifs notamment des stimuli thermiques. Selon la définition de l'IASP, l'hyperalgésie est une douleur amplifiée par un stimulus qui provoque normalement une douleur simple. C'est donc une réponse exagérée à des stimuli nociceptifs, à une stimulation douloureuse. Cette sensation a déjà été évalué dans des modèles animaux neuropathiques diabétiques (induit chimiquement ou génétiquement) qui était accentué montrant l'importance de la douleur neuropathique dans le diabète (O'Brien et al., 2018 ; Sullivan et al., 2007).

iii. Trouble moteur

Des troubles moteurs peuvent aussi être retrouvés dans la neuropathie diabétique. L'atteinte des nerfs périphériques impliquent des difficultés à se déplacer correctement. Le test de Rotarod est le plus utilisé pour étudier ces troubles moteurs. La mesure de la VCN motrice est également un paramètre pour mesurer les troubles moteurs associés.

Dans le cadre de la thèse, la mesure de l'activité locomotrice n'a pas été fait car ceci aurait entrainer des expérimentations supplémentaires et augmenter significativement le temps de manipulation et le nombre d'animaux.

Dans le cas de l'altération des nerfs périphériques, les premiers à être atteints sont les fibres nerveuses de type c. Ce sont des petites fibres non myélinisées qui sont les premières à disparaître par les conséquences (stress du réticulum endoplasmique, production de ROS) du dysfonctionnement de la voie de l'insuline via la mort cellulaire par apoptose. Les fibres A β sont de grosses fibres nerveuses myélinisées. Ce sont les dernières à être atteinte par la neuropathie diabétique mais aussi celles qui sont facilement identifiables sur un tracé de VCN. Le retard de latence remarqué sur le tracé des VCN est expliqué par l'atteinte de ces fibres A β myélinisées (O'Brien et al., 2014). Cependant, notre test de VCN n'est pas le plus adapté. Les autres fibres présentes dans le nerf périphérique (A δ et c) ne sont pas visibles sur le tracé de VCN avec le matériel à disposition.

Des études associent également des analyses histologiques des nerfs sciatiques, nous nous sommes focalisés uniquement sur l'histologie cochléaire (Sullivan et al., 2007).

e) Conclusion

Donc, ce travail nous a permis d'établir qu'une dose de STZ200 induisait une hyperglycémie pathologique stable d'installation plus ou moins rapide selon la souche de souris utilisées (48h pour les souches C57Bl/6JrJ et C57Bl/6NrJ, 2 semaines pour la souche CBA/JrJ). De plus, le phénotypage (poids corporel, VCN, état général) des animaux recevant STZ200 nous a permis d'observer des modifications par rapport aux animaux contrôles. Ainsi l'ensemble de ces modifications nous a conduit à considérer que la STZ induisait un syndrome hyperglycémique métabolique. Celui-ci reproduit fidèlement le phénotype métabolique hyperglycémique permettant d'approcher un modèle de diabète de type 1.

Notre travail a consisté à rassembler les données du taux de glycémie, du poids corporel, d'un score de comportement corporel et de la VCN. Peu d'études travaillant sur la pathologie diabétique neuropathique, utilisent cette mesure de la VCN en complément des paramètres biologiques prouvant l'induction du diabète. De plus, des études évaluant la mesure de la VCN associée à des mesures auditives pour évaluer l'impact d'une neuropathie diabétique sur l'audition n'ont pas été retrouvées dans la littérature scientifique.

Les résultats obtenus dans cette étude nous a permis de constater que :

- La STZ injectée sur des souris C57Bl/6JrJ à la dose de 150 mg/kg n'a pas permis d'induire un syndrome métabolique hyperglycémique rapidement et de façon stable chez le groupe traité.
- La STZ injectée sur des souris C57Bl/6JrJ à la dose de 200 mg/kg a permis d'induire un syndrome métabolique hyperglycémique rapidement et stable avec des signes électrophysiologiques de neuropathie périphérique et une cassure de la courbe du poids corporel.
- La STZ injectée sur des souris C57Bl/6JrJ à la dose de 125 mg/kg a pas permis d'induire une hyperglycémique à « bas-bruit » c'est-à-dire sans expression clinique sur les paramètres physiologiques étudiés (poids corporel, vitesse de conduction neurale).

- La STZ injectée sur des souris CBA/JrJ à la dose de 150 mg/kg n'a pas permis d'induire un syndrome métabolique hyperglycémique rapidement et de façon stable chez le groupe traité.
- La STZ injectée sur des souris CBA/JrJ à la dose de 200 mg/kg ne permet d'induire un syndrome métabolique hyperglycémique chez l'ensemble des souris injectées

L'objectif de ce protocole n° 1 était d'établir un modèle de SMH sur la souche de souris C57Bl/6JrJ et CBA/JrJ. Nous avons ainsi à l'aide d'une dose unique de STZ₂₀₀ injectée en IP constaté une hyperglycémie sévère pathologique (>500mg/dL) et chronique qui est observée 48h après l'administration de STZ₂₀₀. Nous avons également constaté que ce SMH est associé avec des altérations de la croissance de la courbe de poids corporel et de la conduction nerveuse périphérique.

Dans la suite de ce projet, nous reproduirons -sur les souches de souris C57Bl/6JrJ et CBA/JrJ- ce « modèle » de SMH avec STZ₂₀₀ pour étudier les possibles altérations associées de la fonction auditive (Etude n°2).

De même, nous ne réutiliserons pas les doses STZ₁₅₀ et STZ₁₂₅ qui sont très intéressantes car elles induisent un tableau clinique d'hyperglycémie à « bas-bruit ». En effet, elles ne sont pas associées avec des signes caractéristiques d'une pathologie « diabétique » que sont la perte de poids et la neuropathie périphérique. Néanmoins, cette hyperglycémie à « bas-bruit », qui est très variable d'un individu à l'autre, pourrait sans doute avoir (à plus ou moins long terme) des effets vasculaires et neurologiques sub-cliniques (sans expression). Cette situation à « bas-bruit » pourrait être retrouvée chez des patients diabétiques dont la pathologie est en cours d'installation et qui s'ignorent malades.

	STZ (mg/kg)	Taux de Glycémie	Poids corporel	Neuropathie périphérique (perte NCV)
C57Bl/6J	150	=	-	=
	200	+++	=	++
CBA/J	150	+	-	=
	200	++	=	+

Tableau 1 : Tableau récapitulatif de l'étude 1 « syndrome hyperglycémique métabolique

f) Réflexions éthiques et le bien-être animal des animaux recevant de la STZ

Dans la littérature scientifique, de nombreuses études indiquent que la STZ injectée à une dose de 200 mg/kg induit une mortalité plus importante chez les animaux recevant la STZ (Furman, 2021 ; Jolivalt et al., 2016).

Cette forte probabilité de mortalité n'a pas été aperçue pour les souches C57Bl/6JrJ et CBA/JrJ contrairement à la souche C57Bl/6NrJ. Ceci nous a conduit à écarter la souche C57Bl/6NrJ de notre projet d'un point de vue du bien-être animal (voir Courbes de suivi. Fiche Matériels et Méthodes n°3 Phénotypage hyperglycémie).

Il est également important de souligner que aucune injection d'insuline n'a été faite durant tout le projet. En effet, l'état général des animaux était tout à fait satisfaisant et peu changé par rapport aux contrôles.

Si nous avions injecté de l'insuline, ceci aurait sans doute amélioré l'état général des souris injectées, mais ceci aurait sans doute modifier l'évolution de l'apparition des manifestations du SMH et donc diminuer ou réduire l'impact sur la fonction auditive. Cependant il aurait été intéressant d'étudier l'effet de l'insuline sur la fonction auditive.

Dans le cadre du bien-être animal, des effets secondaires de l'administration de STZ ont été observés : perte de poids, augmentation de la consommation en eau et polyurie. Malgré ces effets secondaires, l'état général des animaux est resté convenable (pas de piloérection, bonne activité locomotrice, bonne interaction avec les autres animaux de la même cage).

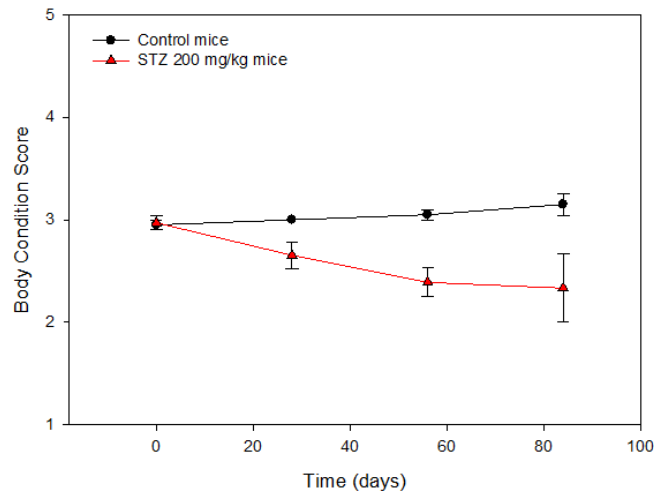
Cependant, il est à noter que pour des facilités d'expérimentation et de surveillance, les animaux ayant reçu de la STZ étaient tous dans la même cage (accès facilité à l'eau et à la nourriture, augmentation du nombre de biberons).

La polyurie des souris diabétiques nous a contraint à faire un change de la litière plus soutenu. Ces changements d'environnement des animaux est connu pour engendrer un stress « de nouveauté » du fait des modifications des habitudes de l'environnement de leur odeur et de leur lieu de repos. Ce changement plus important de la litière peut également réduire les comportements de coprophagie des animaux. Aucune modification de l'état général et aucun état de stress apparent n'ont été observés.

Tous les paramètres corporels et comportementaux des animaux ont été notés et regroupés sous un score de l'état corporel ou Body Condition Score (voir Suivi de l'état général. Fiche Matériels et Méthodes n°3 Phénotypage hyperglycémie).

A

C57Bl/6JrJ



B

CBA/JrJ

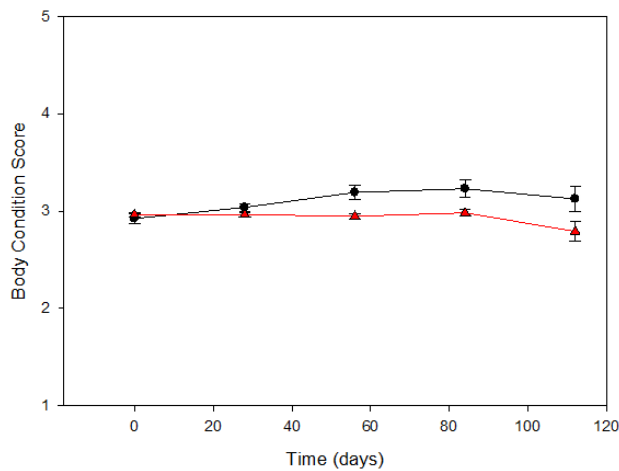


Figure 12 : Représentation du score de l'évaluation de l'état corporel sur la durée des expérimentations pour les souches C57Bl/6JrJ (A) et CBA/JrJ (B)

Pour la souche C57Bl/6JrJ, le score de l'état corporel diminue dans le temps pour les souris injectées avec la STZ à 200 mg/kg par rapport aux souris contrôles qui ont leur score stable sur les 12 semaines d'expérimentations (Figure 30A). Cependant, la différence entre les 2 groupes n'est pas significative.

Pour la souche CBA/JrJ, le score de l'état corporel ne diminue pas dans le temps pour les souris injectées avec la STZ à 200 mg/kg similairement aux souris contrôles sur les 16 semaines d'expérimentations (Figure 30B). La différence entre les 2 groupes n'est pas significative.

g) Perspectives – Etude 1

a) Hyperglycémie à bas bruit – type 2

Cette perspective vient des résultats obtenus pour les souris recevant une injection de STZ à 125 et 150 mg/kg. En effet, les résultats obtenus ont montré une hyperglycémie légère non accompagné d'une perte de poids ou d'une atteinte neuropathique. Ce modèle obtenu pourrait mimer la pathologie humaine du diabète non déclaré ou état prédiabétique.

En effet, de façon insoupçonnée, une personne ayant eu un accident cardiaque peut contracter un diabète non déclaré et ce diabète serait sans doute à l'origine de cet accident cardiaque (Viigimaa et al., 2020).

Donc, cette hyperglycémie dite « silencieuse », car légère et n'impliquant pas d'autres symptômes, est intéressante et sans doute trop souvent écartée des études expérimentales. Cependant les résultats obtenus avec nos modèles à 125 et 150 mg/kg de STZ étaient moyennés, ne reflétant pas la variabilité interindividuelle importante avec des souris ayant une hyperglycémie et d'autres avec une glycémie similaire aux contrôles. Ce projet est également peu compatible avec des souches de souris qui développent des pertes auditives liées à l'âge. Ceci nécessiterait également un maintien à long terme d'animaux présentant une pathologie avec sans doute des risques associés (macroangiopathies, microangiopathies, dégradation de l'état général), ce qui est éthiquement incompatible.

b) Type 2 chez les jeunes

Dans les études observationnelles récentes en clinique et dans les consultations de diabétologie, il apparaît de plus en plus fréquent un diabète de type 2 chez les adolescents. Les modes de consommation alimentaire actuels et le manque important d'activité physique seraient sans doute les causes de ce diabète de type 2. Il serait donc intéressant avec le modèle de STZ à 150 mg/kg d'obtenir une hyperglycémie légère sur des souris jeunes et d'étudier les effets rencontrés.

c) Utilisation d'autres techniques pour confirmer l'hypothèse

Pour s'assurer de l'état hyperglycémique, des mesures de marqueurs sanguins comme l'hémoglobine glyquée A1c (HbA1c) sont essentiels pour confirmer que le diabète a été induit et installé dans le temps. De plus, une analyse immunohistologique des marqueurs inflammatoires (ROS, produits de glycation avancée) au niveau des cellules pancréatiques serait

idéale afin de valider la pathogenèse de la maladie comme montré dans les études cliniques et pré-cliniques

Pour confirmer l'état neuropathique diabétique de nos modèles, l'utilisation d'un deuxième test suivant la vitesse de conduction neurale est préconisée comme le test de Von Frey. Ce test est utilisé afin de montrer une neuropathie douloureuse.

Partie 2 : L'audition : nouvelle complication du diabète

2. Introduction

2.1.Chez l'humain

Les données de la littérature concernant la prévalence de la surdité chez les patients diabétiques (de type 1) sont contradictoires. Selon une récente méta-analyse, la prévalence de la surdité serait évaluée entre 5.17% et 48% chez les patients diabétiques de type 1 (Mujica-Mota et al., 2018). Une autre étude clinique ne révèle aucune différence significative de la prévalence de la surdité chez les patients diabétiques de type 1 comparativement aux sujets non diabétiques (Spankovich et al., 2017). La plupart des études sur la perte auditive chez les personnes diabétiques ont révélé une perte auditive neurosensorielle bilatérale à haute fréquence et à progression lente (Teng et al., 2017 ; Elangovan et Spankovich, 2019). Les outils d'exploration audiolinguistiques sont-ils assez sensibles pour détecter l'installation d'une atteinte auditive subtile ?

2.1.1. Audition : généralités

Le diabète est donc associé à de multiples complications macrovasculaires et microvasculaires, y compris un épaissement de la membrane basale des capillaires de la strie vasculaire sur la paroi latérale de la cochlée et d'autres changements neuropathiques (dysfonction des cellules ciliées internes) pouvant induire une perte auditive (Kim et al., 2017 ; Fukushima et al., 2005).

2.1.1.1. Anatomie/Physiologie cochléaire

L'oreille est composée de 3 parties : oreille externe, moyenne et interne. La cochlée est l'organe de l'audition chez les mammifères qui se situe dans l'oreille interne. Il s'agit d'un tube enroulé en colimaçon, rempli de liquide, autour d'un cône osseux : le modiolus.

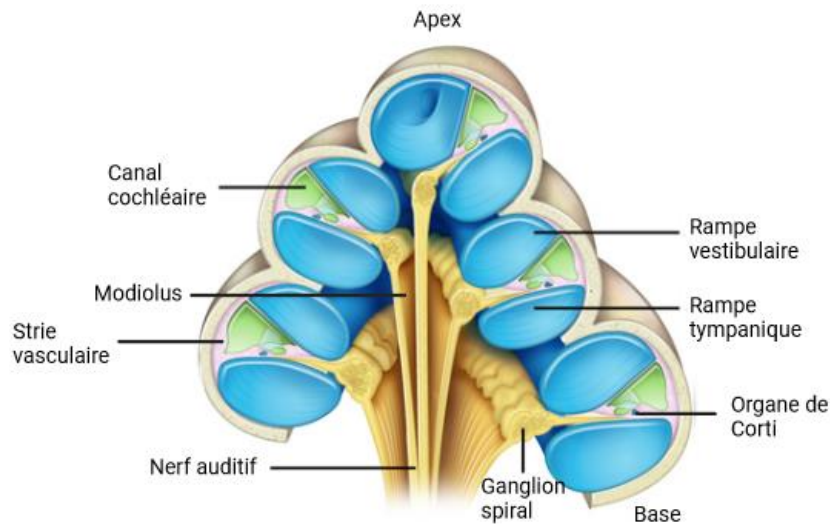


Figure 13 : Schéma d'une cochlée. D'après Saroul et al., 2015. Created with BioRender.com

L'organe de Corti est l'organe auditif de la cochlée. Il se situe dans la partie interne de la cochlée, il comprend des cellules ciliées (composé d'un stéréocil sur l'apex de la cellule) et des cellules de soutien posés sur une membrane dite basilaire baignant dans un liquide riche en ions potassium : l'endolymphe. Ces cellules sont d'origine épithéliale. La membrane basilaire est une matrice extracellulaire qui sépare la scala media (contenant l'endolymphe) de la scala tympani (contenant le périlymphe) et vibre en réponse aux changements de pression induits par le son dans les fluides cochléaires. Les mouvements de la matrice extracellulaire sont détectés par les cellules ciliées de l'organe de Corti (Saroul et al., 2015).

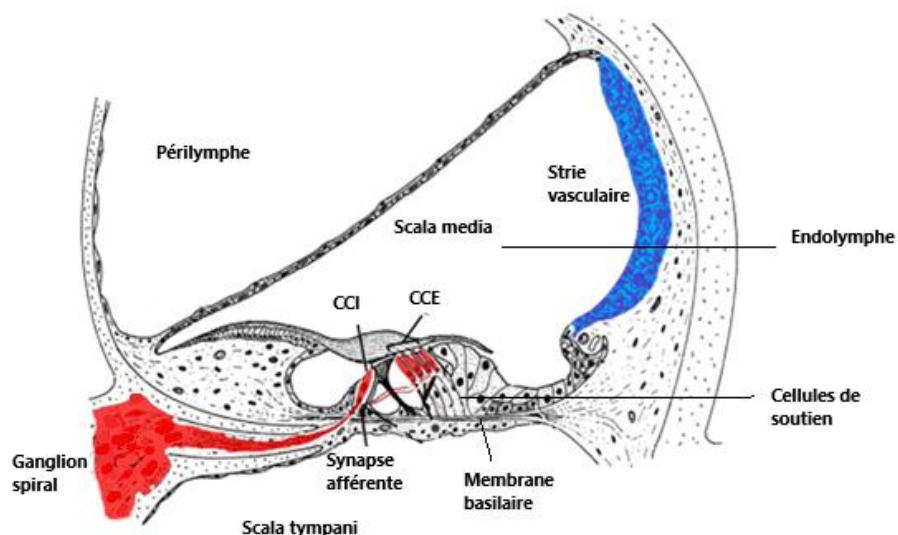


Figure 14 : Coupe coronaire schématique d'une cochlée représentant les différentes structures de l'organe de Corti. D'après Wong et Ryan, 2015.

Parmi les cellules ciliées on distingue deux types : les cellules ciliées internes et externes. Les cellules ciliées internes (CCI), environ 3500 cellules rangées sur une seule ligne, sont le véritable type de cellule sensorielle, envoyant des impulsions électriques via le nerf auditif. Tandis que les cellules ciliées externes (CCE), environ 12500 cellules rangées sur 3 lignes, améliorent les performances de la cochlée en augmentant la sélectivité en fréquence et la sensibilité par une amplification des sons transmis par vibration mécanique. Bien qu'elles ne soient pas les véritables transducteurs du son, les cellules de soutien sur lesquelles reposent les cellules ciliées, sont essentielles et, sans elles, l'audition ne serait pas possible.

Le rôle de ces cellules ciliées est d'effectuer la mécanotransduction, c'est-à-dire la transformation de l'information acoustique (vibrations produites par les sons) en information nerveuse (signaux électriques). Lorsque des ondes sonores externes font vibrer la membrane basale de la cochlée, les cellules ciliées se déplacent par rapport à la membrane tectoriale (membrane coiffant les cellules ciliées). Ce mouvement génère des signaux électriques au niveau des cellules ciliées et transmis au cerveau sous la forme de potentiels d'action via le nerf auditif. Une atteinte de ces cellules ciliées est irréversible et dans ce cas provoque une perte de l'audition permanente (Boucher et Avan, 2023). La perte auditive neurosensorielle est la forme la plus courante de déficience auditive englobant les pathologies de la cochlée et du nerf auditif et peut être d'origine vasculaire ou neurale.

2.1.1.2. Physiologie et Atteinte vasculaire

La source principale de vascularisation de la cochlée se fait par l'artère cochléaire ou artère spiralée modiolaire, une branche de l'artère cérébelleuse antérieure et inférieure. La strie vasculaire est également une zone hautement vascularisée située dans la paroi latérale de la cochlée qui contribue à l'homéostasie cochléaire de deux façons. Tout d'abord, la strie vasculaire contribue directement au maintien du potentiel endocochléaire, qui est nécessaire au processus de mécanotransduction des cellules ciliées (Shi, 2011). Cette action est réalisée par un transport d'ions qui assurent le recyclage actif de l'ion potassium entre l'endolymphe de la scala media et la périlymphe de la scala tympani. La strie vasculaire contribue également à la barrière hémato-cochléaire impliquée dans certains modes d'ototoxicité (cisplatine) ou endommagée par une exposition sonore (Thulasiram et al., 2022 ; Shi, 2016).

Une des caractéristiques majeures de la microcirculation cochléaire est sa capacité d'autorégulation. La régulation du flux sanguin cochléaire est essentielle au bon fonctionnement de la transduction auditive qui demande une importante quantité d'énergie, donc un apport conséquent en oxygène et glucose. Une dérégulation de la microcirculation cochléaire peut se produire dans certains cas. Après une exposition sonore, une perte auditive peut être constatée et pourrait être d'origine vasculaire. En effet, une hypoxie dans la strie vasculaire peut se produire en réduisant la taille des vaisseaux après une exposition sonore. Une autre atteinte auditive d'origine vasculaire est la presbyacousie. Une des causes de la presbyacousie est une perte progressive avec l'âge des capillaires et une microcirculation diminuée au niveau de la strie vasculaire (Boucher et Avan, 2023).

Plusieurs études cliniques ont montré une atteinte de la microcirculation vasculaire auditive chez des personnes diabétiques. En effet, il a été prouvé la présence de récepteurs de l'insuline, de transporteurs de glucose et de composants de signalisation de l'insuline dans les cellules ciliées, les cellules de soutien de la cochlée et dans la strie vasculaire. Cela indique que le système auditif est vulnérable aux altérations de l'utilisation du glucose et aux réactions inflammatoires associées (Huerzeler et al., 2019 ; Edamatsu et al., 2011).

Chez des personnes diabétiques, il a été montré que les parois des vaisseaux sanguins dans la strie vasculaire étaient plus épaisses accompagnées d'une atrophie significative de la strie vasculaire et d'une apoptose des CCE par rapport à des personnes non-diabétiques (Fukushima et al., 2006 ; Fukushima et al., 2005).

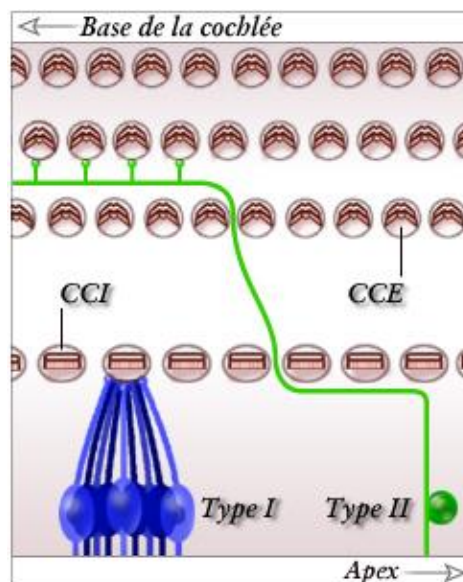
2.1.1.3. Physiologie et Neuropathie auditive

La cochlée est innervée par le nerf cochléaire, branche du nerf cochléovestibulaire ou VIII^e nerf crânien. Ce nerf est formé de neurones sensoriels qui innervent l'oreille interne, c'est-à-dire les récepteurs vestibulaires et auditifs en passant du modiolus jusqu'aux cellules ciliées. Les fibres nerveuses auditives sont au nombre de 30000 à 40000 par oreille.

On distingue trois principaux types de fibres nerveuses. Les premiers types sont les fibres afférentes, représentant environ 90% des fibres nerveuses, qui transmettent l'information des CCI issue de la stimulation acoustique aux noyaux du tronc cérébral, en faisant un premier relais dans le noyau cochléaire. Les seconds types sont les fibres efférentes (environ 10% des fibres) qui inhibent la fonction d'amplificateur cochléaire des CCE pour les fibres venant du complexe olivocochléaire supérieur médial vers les CCE. Les fibres efférentes issues du complexe olivocochléaire supérieur latéral vers la partie postsynaptique des CCI, ont pour rôle

de moduler le taux de décharge des neurones auditifs primaires afférents. Les troisièmes types de fibres sont des fibres nerveuses du système autonome (Carricondo et Romero-Gomez, 2019 ; Guinan, 2018).

Les neurones de la partie auditive ou fibres afférentes cochléaires qui innervent les cellules ciliées de l'organe de Corti, ont leur soma dans le ganglion spiral cochléaire où l'on peut distinguer deux types de neurones. Les neurones afférents de type I représentent 95 % de la population totale. Ce sont des fibres myélinisées, chacun d'entre eux n'innervent qu'une seule CCI. En revanche, les neurones afférents de type II ne représentent que 5 % de la population du ganglion spiral. Ce sont des fibres non myélinisées qui innervent les CCE, de sorte qu'une fibre afférente de type II entre en contact avec plusieurs CCE, mais chaque CCE ne reçoit qu'un seul contact d'un neurone de type II. Les deux types de fibres nerveuses du nerf crânien VIII sont glutamatergiques, mais ces innervations asymétriques des cellules ciliées sensorielles cochléaires pourraient suggérer que les CCI codent le message véritablement auditif, alors que les CCE n'informent que sur les aspects mécaniques de l'état de l'organe de Corti. En réalité, le système nerveux central contrôle l'information transmise par les neurones de type I grâce aux axones du complexe olivocochléaire supérieur qui les innervent pour moduler, filtrer et/ou inhiber l'entrée du message auditif dans le système nerveux central (Boucher et Avan, 2023).



*Figure 15 : Représentation schématique de l'innervation afférente des cellules ciliées.
D'après Kujawa et Liberman, 2015*

Lors de la mécanotransduction, les CCI transforment l'énergie mécanique du son en une libération de neurotransmetteurs glutamatergiques au niveau de la synapse avec les neurones du ganglion spiral. La synapse de la CCI a la capacité de libérer son neurotransmetteur d'une

manière phasique et tonique, même lors d'un stimulus prolongé. Cette particularité est associée à la présence de protéines spécifiques, actuellement pas toutes identifiées, dont certaines ont un rôle essentiel dans l'exocytose du glutamate. Les différentes mutations des gènes codant pour ces protéines dont VGLUT3 (transporteur vésiculaire du glutamate) et otoferlin (senseur de la concentration calcique pour l'exocytose des vésicules) sont responsables de surdités. Ces mutations sont donc à l'origine de synaptopathies et neuropathies auditives (Rance et Starr, 2015 ; Ruel et al., 2008 ; Roux et al., 2006).

La neuropathie auditive est une déficience auditive, elle altère la compréhension de la parole au-delà de ce qui serait attendu sur la base d'audiogramme tonal (Moser et Starr, 2016). Cette atteinte auditive neurosensorielle est caractérisée par une préservation de la fonction des cellules ciliées cochléaires (évaluée par des émissions otoacoustiques (OAE)) et associée à une absence ou désorganisation des potentiels évoqués auditifs (PEA) corroborés par l'absence de réflexe stapédien. Cela peut être expliqué par un encodage neuronal anormal des stimuli sonores. Ce type de déficience auditive peut être causé par des lésions des CCI, des synapses à ruban des CCI ou des neurones du ganglion spiral (Truy et al., 2005).

La perte auditive neurosensorielle peut être congénitale ou acquise en raison d'une exposition prolongée à des bruits forts, des substances ototoxiques ou des maladies systémiques telles que l'hypertension, l'hyperlipidémie et le diabète (Bagai, 2006 ; Gates and Mills, 2005). De plus, des études ont démontré que la surexposition au son provoque une excitotoxicité des synapses des CCI. Ce mécanisme contribue probablement aux troubles auditifs causés par l'exposition au bruit ou à la perte auditive liée à l'âge (Giraudet et al., 2021 ; Kujawa et Liberman, 2015). Certaines pathologies métaboliques ou associées à un trouble de l'énergétique cellulaire (telles que l'ataxie de Friedreich) présentent également une neuropathie auditive avec une dégradation de la fonction auditive au fur et à mesure de l'exposition sonore (Rance et al., 2012). Cependant, l'impact du diabète sur la déficience auditive n'a pas été aussi bien renseigné en comparaison avec les complications microvasculaires connues affectant les systèmes nerveux rénal, visuel et périphérique (Fujita et al., 2012).

Bien que plusieurs théories aient été proposées (dysfonctionnement mitochondrial, démyélinisation du nerf auditif, perte du ganglion spiral et modifications atrophiques des cellules de l'organe de Corti), les mécanismes sous-jacents exacts responsables des lésions du système central auditif induites par le diabète chez l'humain restent incertains. La démyélinisation du nerf auditif est également soupçonnée de favoriser la détérioration acoustique chez les personnes diabétiques. La meilleure façon de déterminer la diminution de

la transmission neurologique est de tester avec les PEA, qui évalue les voies neurales rétrocochléaires. Certaines études ont montré cette hypothèse avec un retard de la latence de l'onde V des PEA chez les personnes diabétiques de type 1 ou de type 2 (Teng et al, 2017 ; Akinpelu et al., 2014)

Ces dernières années, il a été suggéré que la perte auditive liée au diabète était liée à l'état du système nerveux de la cochlée, en particulier à la détérioration des fibres nerveuses afférentes. Cependant, ces études n'ont été rapportées que dans des modèles animaux.

2.1.2. Pathologies syndromiques associant diabète et perte de l'audition

Parmi les microangiopathies méconnues, plusieurs études cliniques ont montré un effet du diabète sur la fonction auditive. Beaucoup de revues scientifiques ont établi une relation entre le diabète et la perte de l'audition.

Perte auditive et diabète sont 2 problèmes de santé publique actuels qui ont une prévalence croissante dans le monde. Plusieurs centaines de millions de personnes dans le monde vivent avec un diabète (surtout celui de type 2) ou avec un déficit auditif. Ces 2 pathologies ont pour facteur de risque commun : l'âge. Ces 2 pathologies ont comme principale conséquence des pertes cellulaires liées à l'âge. Donc il serait facile de faire le parallèle entre ces 2 atteintes (Samocha-Bonet et al., 2021 ; Helzner et Contrera, 2016). L'Association Américaine du Diabète a relevé qu'en plus des complications angiopathiques connues, beaucoup de personnes diabétiques souffraient également d'une perte auditive neurosensorielle, et bien que la perte auditive soit mentionnée comme une conséquence possible du diabète par cette association. Malgré cela, une évaluation de l'audition n'est toujours pas incluse dans le diagnostic préconisé des personnes diabétiques par l'Organisation Mondiale de la Santé (Balduc et Helzner, 2019). Cependant, d'autres études cliniques ont montré aucune différence significative entre les personnes diabétiques et non-diabétiques dans la susceptibilité à une perte d'audition (Seo et al., 2020 ; Spankovich et al., 2017).

La plupart des revues scientifiques évoquant ce lien entre ces 2 pathologies, conclut sur la difficulté de mener des études sur des populations sans biais de facteurs (âge, qualité de vie). Selon ces revues, de nouvelles études précliniques sont nécessaires pour clarifier les mécanismes physiopathologiques spécifiques qui sous-tendent les dommages causés par le diabète sur le système auditif et la manière dont les traitements actuels peuvent contribuer à

inverser les effets physiopathologiques du diabète sur le système auditif (Gioacchini et al., 2023 ; Samochoa-Bonet et al., 2021 ; Balduc et Helzner, 2019).

Néanmoins, le diabète et la perte de l'audition sont associés avec d'autres atteintes dans d'autres pathologies ayant une prévalence moindre comme l'ataxie de Friedreich, le syndrome de Wolfram ou encore la maladie d'Alzheimer.

2.1.2.1. *Ataxie de Friedreich*

L'ataxie de Friedreich a été décrite pour la première fois en 1863 par le médecin allemand Nikolaus Friedreich. L'ataxie de Friedreich est une maladie neurodégénérative rare associant des troubles neurologiques sévères, une atteinte neurodégénérative progressive ainsi que des complications cardiaques et diabétiques. Elle se manifeste par une combinaison de difficultés à se déplacer, de faiblesse musculaire, de perte de sensation et de proprioception, et de troubles de l'élocution. Ces symptômes apparaissent pendant l'enfance et s'aggravent avec le temps en développant dans certains cas un diabète.

La cause de cette maladie est le résultat de mutations du gène de la frataxine qui est responsable de la production de frataxine, une protéine qui contribue à la formation d'enzymes nécessaires à la production d'adénosine triphosphate (ATP) par les mitochondries et à la gestion des réserves de fer. Les cellules très actives qui dépendent de la production d'ATP, telles que les neurones, les cardiomyocytes et les cellules β du pancréas, sont donc affectées (Lynch et al., 2021).

Si depuis de nombreuses années il est connu que les patients atteints d'ataxie de Friedreich présentent un risque accru de développer un diabète (avec une incidence entre 6% et 19%) et une intolérance au glucose (près de 49% des patients), une étude récente vient de préciser les mécanismes sous-jacents dans le diabète associé à l'ataxie de Friedreich. Ainsi, la résistance à l'insuline fréquemment observée dans l'ataxie de Friedreich serait due à une défaillance des cellules β pancréatiques (Cnop et al., 2013 ; Cnop et al., 2012).

Il a également été montré que chez les patients atteints d'ataxie de Friedreich, la défaillance mitochondriale entraîne une altération de l'énergie cellulaire. De nombreux patients atteints d'ataxie de Friedreich présentent également une déficience auditive dans le bruit (Rance et al., 2012). En effet, dans certains cas ils peuvent présenter des PEA en réponse à des séries de stimuli courtes mais pas longues. Une exposition prolongée conduirait à des augmentations graduelles de la latence des ondes auditives PEA. Le manque de production d'ATP serait une explication probable de la neuropathie auditive dans l'ataxie de Friedreich (Giraudet et al.,

2018). La défaillance mitochondriale pourrait expliquer l'association d'un diabète et d'une susceptibilité à la perte de l'audition.

2.1.2.2. *Syndrome de Wolfram*

Le syndrome de Wolfram a été décrit pour la première fois en 1938 par Wolfram et Wagener. Le syndrome de Wolfram est une pathologie neurodégénérative et génétique rare caractérisée par un diabète d'apparition juvénile (type 1), un diabète insipide, une atrophie du nerf optique, une perte auditive et une neurodégénérescence. La prévalence du syndrome de Wolfram est estimée à 1/770 000 à travers le monde (Barrett et Bunday, 1997). Il existe plusieurs formes de syndrome de Wolfram : type 1 et type 2. Le syndrome de type 1 représente 90% des cas.

La première manifestation de la maladie est le diabète de type 1 qui est diagnostiqué à l'âge enfant. L'atrophie du nerf optique marquée par la perte de la vision périphérique est généralement la 2^e manifestation suivie par le diabète insipide puis la surdité neurosensorielle. Environ 65 % des patients développent une surdité de perception sur les hautes fréquences progressive dont la gravité peut aller d'une surdité de naissance à une légère perte auditive à l'adolescence qui s'aggrave avec le temps (Karzon et al., 2018 ; Urano, 2016).

Comme pour l'ataxie de Friedreich, la cause de la maladie de type 1 résulte dans la plupart des cas de la mutation du gène WFS1 qui est responsable de la production de wolframine. La wolframine est une protéine transmembranaire qui régule certains mécanismes de l'homéostasie calcique du réticulum endoplasmique et joue donc un rôle dans l'apoptose cellulaire. La mutation de ce gène a pour conséquence la non-régulation des niveaux de calcium cellulaire et donc le dysfonctionnement du réticulum endoplasmique. Cela induit notamment la mort des cellules β du pancréas qui produisent l'insuline provoquant ainsi un diabète de type 1 (Rigoli et al., 2022).

Un autre gène est également responsable d'une forme de la maladie : le gène CISD2 responsable du syndrome de Wolfram de type 2. Ce gène régule la production de protéines situées sur la membrane externe des mitochondries. La mutation de CISD2 entraîne la production de protéine CISD2 anormalement petite et non-fonctionnelle. Cela cause un dysfonctionnement de la mitochondrie qui se détériore. Ce syndrome de type 2 est associé essentiellement au diabète de type 1, à l'atrophie du nerf optique et à la surdité neurosensorielle progressive sur les hautes fréquences (Rosanio et al., 2022). Comme pour l'ataxie de Friedreich,

la défaillance mitochondriale pourrait expliquer l'association d'un diabète de type 1 et une susceptibilité à la perte de l'audition.

2.1.2.3. *Syndrome d'Alström*

Le syndrome d'Alström est une autre pathologie associant diabète et atteinte auditive. Il a été décrit pour la première fois par Alström en 1959. C'est une maladie multi-systémique rare caractérisée par une dystrophie des cônes et des bâtonnets, une surdité précoce, une obésité, une résistance à l'insuline qui se caractérise par un diabète de type 2, une cardiomyopathie dilatée et un dysfonctionnement hépatique et rénal progressif (Alström et al., 1959). La prévalence du syndrome d'Alström est estimée à 1/1 000 000 en Europe. Son diagnostic est difficile et peut être confondu selon les symptômes avec le syndrome de Wolfram.

Cette maladie touche essentiellement les enfants et les nourrissons qui sont atteints d'une surdité à la naissance associée à de multiples syndromes métaboliques dont le diabète de type 2 et l'obésité. L'espérance de vie est très faible pour les patients atteints de ce syndrome. Très peu de cas ont été recensés dans le monde.

Le syndrome d'Alström est dû à des mutations du gène ALMS1. Sa fonction moléculaire demeure inconnue à ce jour, mais il pourrait être impliqué dans la fonction ciliaire, le contrôle du cycle cellulaire et le transport intracellulaire (Beqiri-Jashari et al., 2022).

2.1.1.4. *Maladie d'Alzheimer (ou diabète de « type 3 »)*

Un autre diabète est également décrit mais il est associé à une maladie neurodégénérative liée à l'âge : la maladie d'Alzheimer.

Cette association a été établie par le fait que le moindre apport en sucres dans les neurones cibles provoqué par l'insulinorésistance du diabète de type 2 causerait des atteintes cognitives similaires aux symptômes de la maladie d'Alzheimer (De la Monte et Wands, 2008). Ce postulat consiste à établir une origine métabolique à la maladie d'Alzheimer. Cependant, il existe trop de facteurs indépendants pouvant établir un lien entre perte de l'audition liée à l'âge et diabète de type 2 pour les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ce postulat est très discuté dans le monde scientifique.

2.2. Chez l'animal

De nombreuses études précliniques ont révélé que des pertes massives de cellules ciliées internes, ou de fibres nerveuses pouvaient être sans conséquence sur les seuils liminaires (seuils de détection, déterminés par l'audiométrie) (Fujita et al., 2012). L'atteinte auditive chez les patients diabétiques pourraient donc être sous-estimées car mal évaluée. Il semble donc indispensable de documenter du point de vue fonctionnel et histologique plus précisément sur des modèles murins cette complication « silencieuse » du diabète.

2.2.1. *Quel lien avec l'audition ?*

Des études cliniques et de méta-analyse ont montrées que le lien entre diabète et perte auditive était possible avec des atteintes vasculaires (Fukushima et al., 2006) hypothétiquement associé à des atteintes neurales (AlJasser et al., 2020 ; Teng et al., 2017 ; Akinpelu et al., 2014). Il a été conclu de nouvelles études pré-cliniques étaient nécessaires pour clarifier les mécanismes physiopathologiques spécifiques qui sous-tendent les dommages causés par le diabète sur le système auditif (Samocho-Bonet et al., 2021).

A travers ces études cliniques, plusieurs théories ont été proposées mélangeant atteintes vasculaires et neurales : microangiopathie, produits finaux de glycation avancée, stress oxydatif réactif et dysfonctionnement mitochondrial, démyélinisation du nerf auditif, perte du ganglion spiral et modifications atrophiques des cellules de l'organe de Corti. De nombreuses études réalisées sur des modèles animaux ont tenté d'étudier les altérations survenant dans les sous-structures cochléaires après un état diabétique prolongé.

2.2.2. *Etudes précliniques sur les pathologies associant diabète et perte auditive*

Parmi les pathologies associant diabète et perte auditive avec d'autres atteintes (par exemple une atteinte visuelle pour le syndrome de Wolfram ou atteinte motrice pour l'ataxie de Friedreich), des modèles animaux de ces pathologies ont été créés pour comprendre les mécanismes physiopathologiques causant les dommages sur le système auditif.

2.2.2.1. Ataxie de Friedreich

Des études récentes ont montré que les patients atteints d'ataxie de Friedreich présentaient un dysfonctionnement de la transmission dans les voies neuronales auditives (Giraudet et al., 2018 ; Rance et al., 2012). Une étude préclinique a tenté de caractériser les déficits auditifs dans un modèle murin de l'ataxie de Friedreich. Cette étude a révélé des changements dégénératifs dans la structure et la fonction auditives chez des souris ataxiques de Friedreich. Malgré des seuils auditifs stables, ces souris présentaient une dégénérescence du nerf auditif montrée par une diminution du nombre de neurones du ganglion spiral. Ce modèle murin tendrait à montrer que l'atteinte auditive serait d'origine neurale (Rance et al., 2023).

2.2.2.2. Syndrome de Wolfram

Comme la perte progressive de l'audition est une caractéristique clinique du syndrome de Wolfram, un modèle de rat du syndrome de Wolfram a été créé pour comprendre ce mécanisme (Jagomäe et al., 2021). Cependant, la perte auditive progressive est difficile à modéliser chez les animaux, étant donné qu'elle est également variable chez les patients humains. Sur ce modèle de rat, Jagomäe et al., ont essayé un traitement pouvant réduire les effets de la maladie. Si ce traitement a montré des progrès sur l'état diabétique, il n'y a pas eu d'effet sur la perte auditive. Les mécanismes causant cette perte auditive restaient inconnus empêchant de comprendre le rôle de la protéine Wolframin dans la voie auditive (Jagomäe et al., 2023). Cependant, une autre étude a modélisé une souris knock-in, la lignée Wfs1E864K, présentant une mutation humaine conduisant à une surdité sévère chez les individus atteints. Leurs résultats ont montré que la protéine Wolframin joue un rôle dans le maintien du potentiel endocochléaire et de la strie vasculaire. Ce modèle murin tendrait à montrer que l'atteinte auditive serait d'origine vasculaire dans le syndrome de Wolfram (Richard et al., 2023).

2.2.2.3. Atteinte auditive d'origine vasculaire (strie vasculaire, CCE)

Il existe beaucoup d'études précliniques qui ont observé des altérations de l'oreille interne sur des modèles animaux de diabète. En premier lieu, l'hypothèse de l'atteinte vasculaire s'est posée. Chez l'humain, il a été montré une microangiopathie cochléaire avec une dégénération de la strie vasculaire et des CCE (Fukushima et al., 2006). Cette hypothèse est également la plus facilement vérifiable avec des techniques faciles à réaliser (analyse

histologique ou enregistrement d'otoémissions acoustiques, une technique non-invasive permettant de vérifier la fonctionnalité des CCE). La microangiopathie cochléaire, observée par un épaissement de la strie vasculaire, de l'artère modiolaire spirale cochléaire et un flux sanguin réduit, a été vérifiée sur des modèles animaux de tous types de diabètes (Seo et al., 2022 ; McQueen et al., 1999 ; Smith et al., 1995). Cette microangiopathie cochléaire a été observée par une expansion de l'endolymphe induit par une insulino-résistance sur un modèle de diabète de type 2 (Palbrink et al., 2020).

2.2.2.4. Atteinte neurale (CCI, fibres nerveuses, voie centrale)

Cependant, il a également montré dans la littérature scientifique, que les troubles auditifs causés par le diabète pourraient être d'origine neurale. Sur des modèles murins diabétiques de STZ, l'hyperglycémie associée au diabète de type 1 ou de type 2 a provoqué un dysfonctionnement du nerf auditif (retard des latences des ondes PEA). Tandis que l'hyperinsulinémie associée au diabète de type 2 a provoqué un dysfonctionnement à la fois des voies auditives centrales (retard de latence et diminution de l'amplitude des ondes Na-Pa correspondant à la région thalamique de la voie auditive) et des cellules ciliées cochléaires (Hong et Kang, 2014 ; Hong et Kang, 2008).

Des modèles diabétiques de STZ ont démontré une plus grande susceptibilité au bruit (trauma sonore) avec un flux sanguin cochléaire réduit et une strie vasculaire plus épaisse montrant une atteinte vasculaire. Cependant cette atteinte vasculaire a été accompagnée par une atteinte neurale avec une perte des neurones du ganglion spiral établissant une possible neuropathie auditive (Fujita et al., 2012 ; Lee et al., 2021). Une autre étude a suggéré que les souris diabétiques induit génétiquement (C57Bl/6J Lepr^{db/db}) semblaient être plus sensibles aux traumatismes sonores. Les souris diabétiques ont développé une perte auditive importante montrée par des lésions graves des cellules ciliées et une synaptopathie due à l'augmentation des réponses inflammatoires et de la production de ROS chez les souris diabétiques (Han et al., 2018). Cependant, cette susceptibilité au bruit pour les souris diabétiques n'est pas encore un consensus scientifique (Yang et al., 2015).

Ces modèles de STZ montrant une atteinte auditive ne sont pas dépendants des souches murines utilisées. La souche CBA/J, qui possède une audition stable sur 2 ans, a montré une amplification de la perte auditive liée à l'âge avec une augmentation de ses seuils auditifs quand elle est atteinte de diabète (Vasilyeva et al., 2009).

Une autre étude utilisant un modèle diabétique de type 1 induit génétiquement (Akita) a montré que la perte auditive dans le diabète de type 1 était causée non seulement par un déséquilibre ionique et des troubles de la circulation sanguine dans l'endolymphe cochléaire, mais aussi par la dégénérescence du système nerveux via une atteinte des mitochondries dans les neurones du ganglion spiral et la mort cellulaire médiée par l'apoptose (Lee et al., 2020).

Concernant les atteintes liées à la voie mitochondriale, une étude récente sur un modèle murin de diabète (C57Bl/6J $Lepr^{db/db}$) a mis en évidence des altérations de la structure et de la morphologie des mitochondries dans la strie vasculaire, des mitochondries des CCI et des CCE ainsi que celles dans les synapses des neurones du ganglion spiral. Le dysfonctionnement mitochondrial serait profondément impliqué dans la perte auditive diabétique, et pourrait suggérer les avantages potentiels des stratégies thérapeutiques ciblant les mitochondries (Lyu et al., 2021).

Des études ont montré que des stratégies thérapeutiques pourraient être mis en place. Sur des modèles diabétiques induit chimiquement par la STZ, des améliorations sur les seuils auditifs, une diminution de la dégradation des cellules ciliées et des neurones du ganglion spiral a été aperçu. Ces stratégies consistaient à administrer des molécules (Rutine, Thioredoxine) ayant un effet anti-oxydatif pour lutter contre la production de ROS, responsable du stress oxydatif dans les neurones (Doostkam et al., 2021 ; Ren et al., 2021).

Toutes ces études précliniques ont confirmé plusieurs théories concernant le lien diabète et audition associant des atteintes vasculaires et neurales : microangiopathie, produits finaux de glycation avancée, stress oxydatif réactif et dysfonctionnement mitochondrial, démyélinisation du nerf auditif, perte du ganglion spiral et modifications atrophiques des cellules de l'organe de Corti. Malgré tout, cela reste encore peu documenté et cette capacité de reproductibilité des résultats reste encore à prouver.

3. Objectif de la thèse

3.1. Contexte de mon travail

Il a été vu que le risque d'avoir une atteinte auditive était deux fois plus élevé chez les individus diabétiques par rapport à des individus non-diabétiques. Différentes études épidémiologiques traitant sur cette association ont montré une plus grande prévalence au développement d'une perte auditive bilatérale chez les diabétiques « jeunes » (moins de 50 ans) (Spankovich et al., 2019 ; Kim et al., 2017). Pour autant aucun lien de causalité n'a pu être réellement établi, seulement des hypothèses.

Ces hypothèses tendent à montrer que cette association entre diabète et perte auditive aurait plusieurs origines. Tout d'abord une atteinte vasculaire par une dégradation de la microcirculation sanguine de la cochlée qui induirait une perte des CCE (Fukushima et al., 2006 ; Fukushima et al., 2005). Cette atteinte vasculaire peut être liée dans certains cas à une atteinte neurale montrée par des mesures électrophysiologiques (PEA) qui indiquerait une atteinte des fibres nerveuses (Teng et al., 2017 ; Akinpelu et al., 2014).

Cette recherche de lien de causalité est d'actualité. Sans connaître les mécanismes sous-tendant ces pathologies, des campagnes de prévention et de documentation se font de plus en plus fréquemment ces dernières années montrant un intérêt croissant pour ces pathologies touchant de plus en plus de personnes dans le monde.

Même au sein de notre laboratoire, une étude clinique a vu le jour montrant une altération des performances neurales auditives chez les patients diabétiques de type 2 et qu'il est nécessaire d'utiliser de tests supplémentaires pour évaluer la fonction auditive-neurale chez les sujets diabétiques dont l'audition est altérée (Giraudet et al., 2022).

Il reste donc à déterminer si la perte auditive est associée au diabète indépendamment du contrôle glycémique. La perte auditive a son propre ensemble de facteurs de risque et en partage d'autres avec le diabète comme l'âge ou la qualité de vie. C'est pourquoi l'utilisation du modèle animal est primordial pour étudier et caractériser ce possible lien. Beaucoup de recherches précliniques ont étudié et tenté d'apporter des explications à cette association de pathologies. Certaines études ont affirmé ou non les hypothèses cliniques précédemment décrites et en ont développé d'autres (atteinte mitochondriale) (Lyu et al., 2021). Cependant, la plupart de ces études ont utilisé des modèles animaux propres à leur laboratoire manquant de pertinence dans leur recherche.

Mon projet de thèse a consisté à obtenir une preuve de concept sur modèle murin d'une possible atteinte auditive consécutive de l'induction d'un diabète. Le but a donc été de créer un modèle de jeune souris diabétique (étude 1) montrant une neuropathie périphérique et caractériser si une atteinte auditive était induite par ce diabète. Si oui, quelle en serait l'origine (vasculaire ou nerveuse) en utilisant des tests d'explorations fonctionnelles mesurant le système auditif périphérique (PDA, PEAp) et central (PEAlm) complétés par une analyse histologique.

Etude n°2 de l'impact d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la fonction auditive périphérique sur des modèles murins

L'objectif de cette étude n°2 est d'examiner -par des approches fonctionnelles et histologiques- les possibles conséquences d'un syndrome métabolique hyperglycémique (induit par une injection de streptozotocine à 200mg/kg) sur la fonction auditive périphérique chez 2 souches de souris : C57Bl/6JrJ et CBA/JrJ.

I) Protocole n°1

Etude de l'impact d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la fonction auditive périphérique chez des souris de souche C57Bl/6JrJ

Induction syndrome métabolique hyperglycémique sur la souche C57Bl/6JrJ

Dans le cadre de l'étude 1, qui a porté sur la mise au point d'un modèle de syndrome métabolique hyperglycémique sur la souche C57Bl/6JrJ, nous avons ainsi pu établir un protocole qui induit une hyperglycémie pathologique rapide (installation en 48h) et stable (sur 16 semaines de suivi).

Nous avons ainsi constitué un groupe contrôle de 21 souris mâles C57Bl/6JrJ et un groupe de 22 souris mâles C57Bl/6JrJ traitées STZ₂₀₀. Lors de l'administration de la STZ₂₀₀, toutes les souris C57Bl/6JrJ étaient âgées de 6 semaines. Toutes les explorations fonctionnelles auditives (DPOAE et PEAp) ont été réalisées sous anesthésie générale gazeuse (isoflurane 4% lors de l'induction puis 1,5% lors du maintien) avec monitoring et maintien de la température corporelle.

Les graphiques suivants – évolutions du taux de glycémie, du poids corporel, de la vitesse de conduction neurale - illustrant l'impact de l'administration de STZ₂₀₀ présentent les caractéristiques identiques comme précédemment décrites dans la première étude de l'installation d'un syndrome métabolique hyperglycémique de la souche C57Bl/6JrJ.

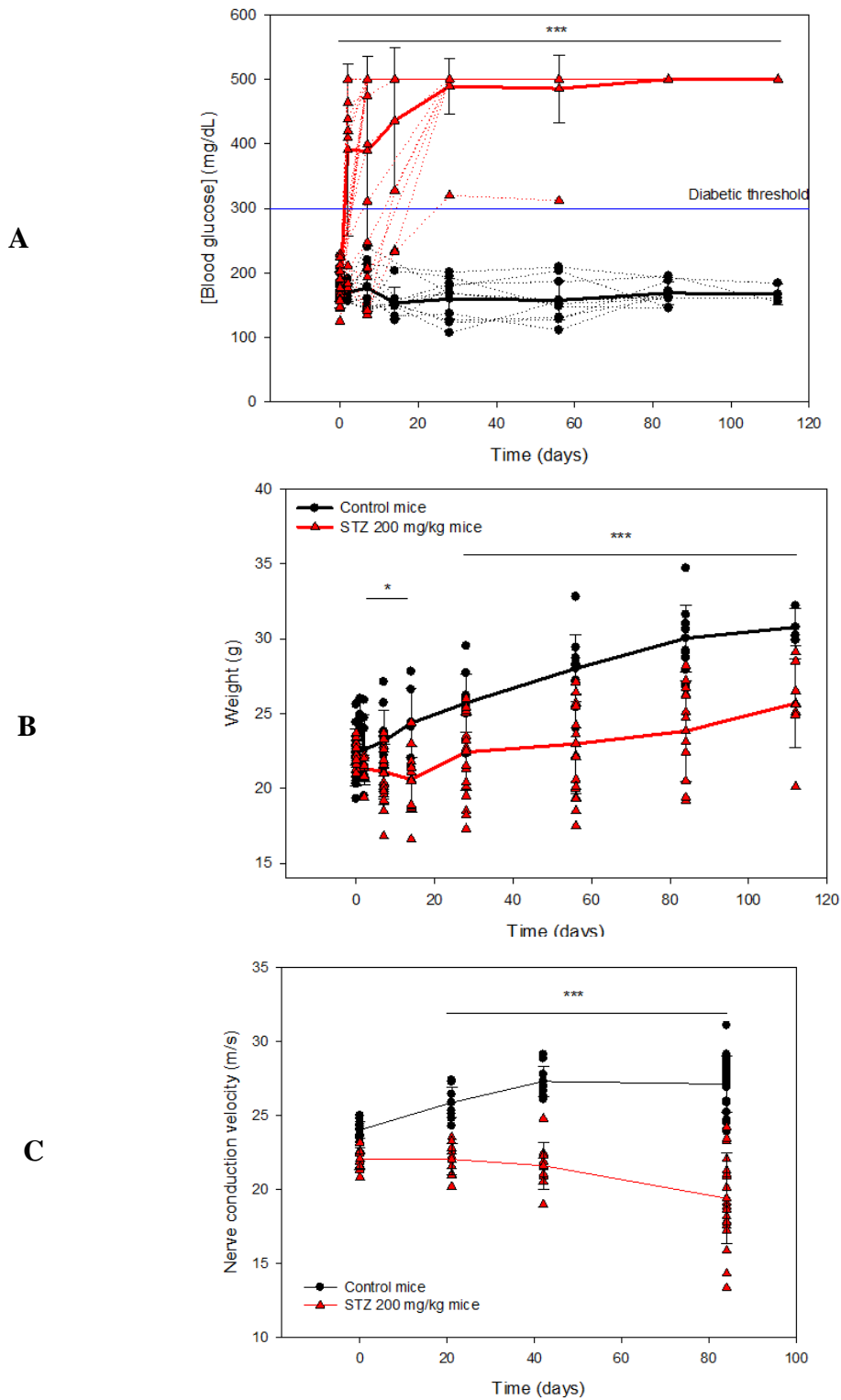


Figure 16 : Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ.

La mesure du taux de glycémie (panel A), du poids corporel (panel B) et de la vitesse de conduction nerveuse caudale (panel C) ont été réalisées pendant 16 semaines après l'administration par une injection unique d'une dose de streptozotocine à la dose de 200mg/kg. Les données moyennées (moyenne \pm écart type) et les données individuelles sont représentées.

T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Taille des groupes : souris contrôles C57Bl/6JrJ (n=21), souris C57Bl/6JrJ STZ 200 mg/kg (n=22).

A) Etude des Produits de distorsion acoustique

Seuils auditifs acoustiques

La mesure des produits de distorsion acoustiques (PDA) nous permet d'évaluer de façon rapide objective et non-invasive la fonctionnalité des cellules ciliées externes. A l'aide d'un protocole de présentation de stimuli de différentes fréquences à différentes intensités (8, 12, 16, 24 et 32 kHz entre 20 et 70 dB SPL) il est possible pour chaque souris de déterminer un seuil auditif acoustique correspondant à une émergence de la réponse des PDA au minimum de 7 dB au-dessus du bruit de fond.

Suite à l'administration d'une dose unique STZ₂₀₀, certains animaux traités présentent à partir de 8 semaines une évolution des seuils auditifs acoustiques affectant les hautes fréquences (24 & 32 kHz). Cette variabilité des réponses est observée à partir de 8 semaines post injection STZ₂₀₀. A 16 semaines post injection STZ₂₀₀, aucune réponse acoustique en PDA n'est mesurable pour tous les animaux traités sur les hautes fréquences (24 & 32 kHz). Pour les animaux contrôles, cette évolution des seuils auditifs acoustiques est également constatée mais de façon moins drastique et avec également une certaine variabilité inter-individuelle. En effet si, à 16 semaines post injection STZ₂₀₀, certaines souris contrôles présentent encore des réponses à 32 kHz, il est important de souligner que la majorité de celles-ci présentent encore des PDA à la fréquence de 24 kHz.

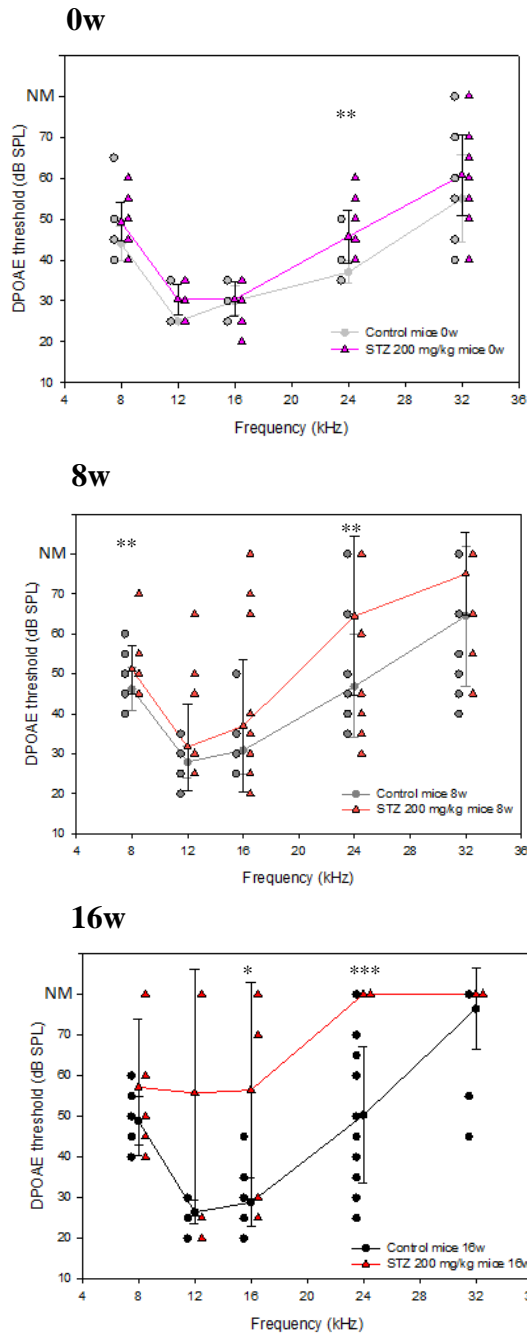


Figure 17 : Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ sur les produits de distorsion acoustiques.

Les données moyennées et les données individuelles des seuils auditifs acoustiques sont représentées pour 3 temps de suivi post-injection STZ₂₀₀ (avant, 8 et 16 semaines de suivi) pour les fréquences de 8, 12, 16, 24 et 32 kHz.

T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Taille des groupes : souris contrôles C57Bl/6JrJ (n=21), souris C57Bl/6JrJ STZ 200 mg/kg (n=22).

B) Etudes des Potentiels évoqués auditifs précoces

a) *Seuils auditifs électrophysiologiques*

La mesure des potentiels évoqués auditifs précoces (PEAp) nous permet d'évaluer de façon objective et non-invasive la fonction auditive jusqu'au niveau du tronc cérébral.

A l'aide d'un protocole de présentation de stimuli de différentes fréquences à différentes intensités (8, 12, 16, 24 et 32 kHz entre 10 et 100 dB SPL) il est possible pour chaque souris de déterminer un seuil auditif électrophysiologique, des latences et amplitudes des ondes I III et V. La détermination du seuil correspond la plus petite intensité de stimulation permettant de visualiser l'émergence de l'onde I (avec une reproductibilité sur 2 courbes mesurées de façon successive).

Si le seuil auditif acoustique -mesuré à l'aide des PDA- présentait une évolution sur les hautes fréquences (24 & 32 kHz) dès 8 semaine post-injection STZ₂₀₀, l'évolution du seuil auditif électrophysiologique -mesuré à l'aide des PEA_p -reste identique pour les 2 groupes d'animaux jusqu'à 8 semaines. Si pour les animaux contrôles les seuils auditifs électrophysiologiques restent en moyenne identiques jusqu'à la 16^{ème} semaine sur l'ensemble des fréquences évaluées, nous constatons une nette augmentation des seuils auditifs électrophysiologiques moyens pour les animaux traités STZ₂₀₀ (Seuil_{8kHz-112j-ctl} = 32,5 ± 6,9 dB SPL, Seuil_{8kHz-112j-STZ200} = 50,0 ± 18,9 dB SPL, Seuil_{12kHz-112j-ctl} = 25,9 ± 10,8 dB SPL, Seuil_{12kHz-112j-STZ200} = 50,0 ± 23,6 dB SPL, Seuil_{16kHz-112j-ctl} = 22,6 ± 12,6 dB SPL, Seuil_{16kHz-112j-STZ200} = 47,1 ± 20,6 dB SPL, Seuil_{24kHz-112j-ctl} = 46,5 ± 14,9 dB SPL, Seuil_{24kHz-112j-STZ200} = 80,0 ± 19,4 dB SPL, Seuil_{32kHz-112j-ctl} = 62,4 ± 10,9 dB SPL, Seuil_{32kHz-112j-STZ200} = 83,6 ± 16,0 dB SPL).

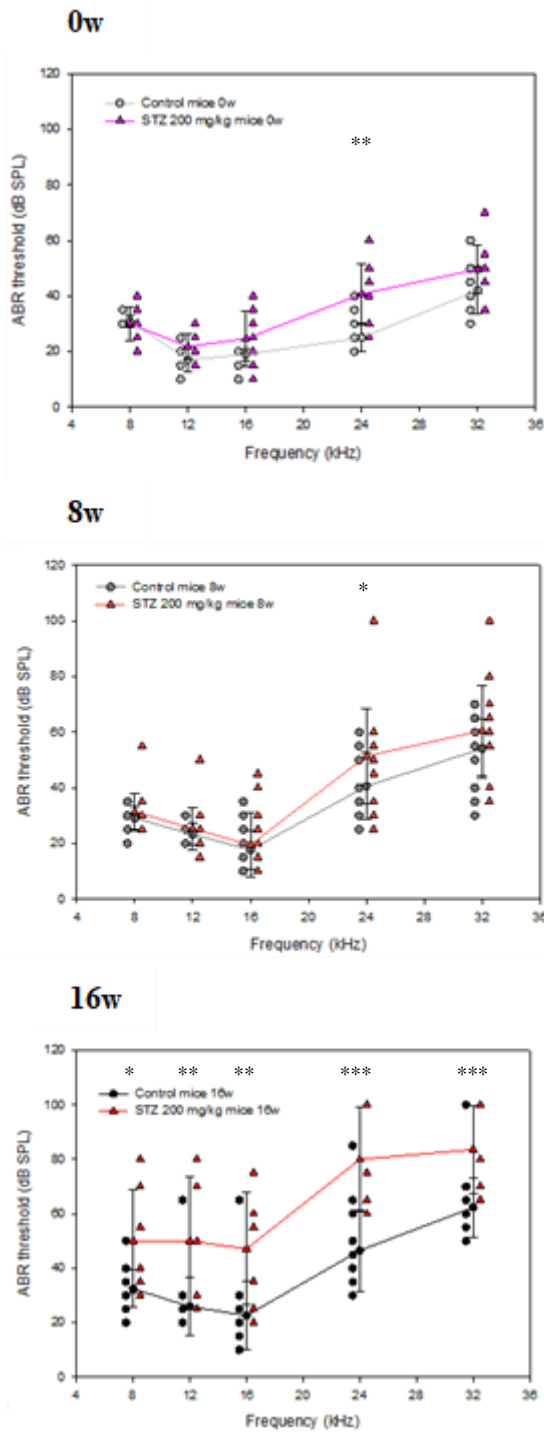


Figure 18 : Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ sur les potentiels évoqués auditifs précoces.

Les données moyennées et les données individuelles des seuils auditifs électrophysiologiques sont représentées pour 3 temps de suivi post-injection STZ₂₀₀ (avant, 8 et 16 semaines de suivi) pour les fréquences de 8, 12, 16, 24 et 32 kHz.

T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Taille des groupes : souris contrôles C57Bl/6JrJ (n=21), souris C57Bl/6JrJ STZ 200 mg/kg (n=22).

b) Comparaison seuils auditifs acoustiques et électrophysiologiques

Les graphiques suivants permettent de comparer les seuils auditifs acoustiques et électrophysiologiques des 2 groupes d'animaux contrôles et traités pour les fréquences de 8, 16, 24 et 32 kHz avant et 16 semaines post-injection STZ₂₀₀. Ce type de représentation permet de visualiser chez les animaux contrôles de constater que l'évolution des seuils auditifs acoustiques est parallèle à l'évolution des seuils auditifs électrophysiologiques. Nous constatons que pour certains animaux traités STZ₂₀₀ il y a une dégradation plus marquée de leur fonction auditive. Les seuils auditifs électrophysiologiques subissent la même évolution que les seuils auditifs acoustiques. Ceci ne révèle pas d'atteinte plus spécifique des cellules ciliées externes ou des voies auditives neurales sur les aspects de détection (seuils auditifs) de la fonction auditive.

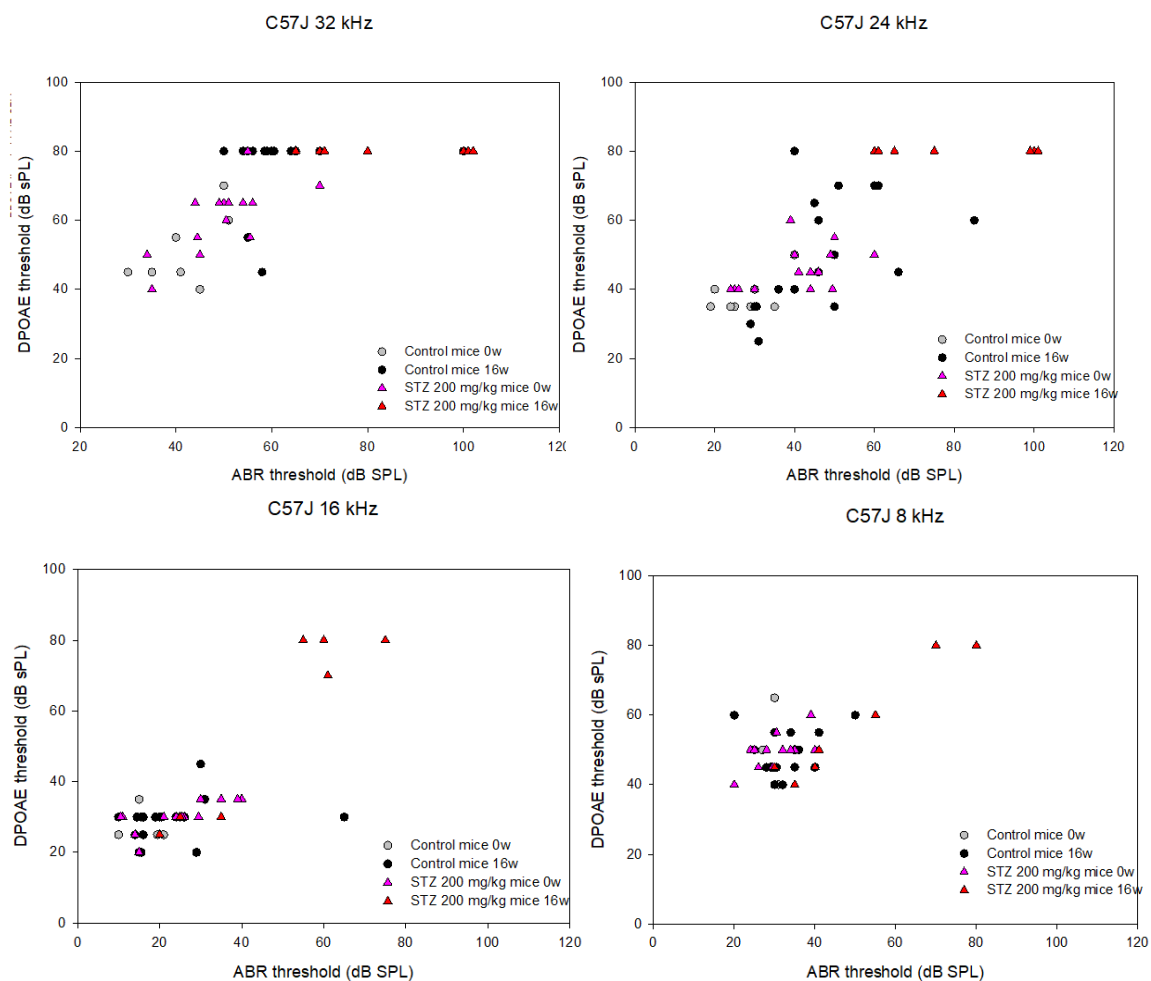


Figure 19 : Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ sur les potentiels évoqués auditifs précoces et les produits de distorsion acoustiques

Les données individuelles des seuils auditifs électrophysiologiques et acoustiques sont représentées pour 2 temps de suivi post-injection STZ₂₀₀ (avant et 16 semaines de suivi) pour les fréquences de 8, 16, 24 et 32 kHz.

Taille des groupes : souris contrôles C57Bl/6JrJ (n=21), souris C57Bl/6JrJ STZ 200 mg/kg (n=22).

c) Latences des ondes I, II et V

Les latences des ondes I, II et V ont été déterminées sur des tracés de PEAp obtenus avec une intensité de présentation de 70 dB SPL pour chaque fréquence (8, 12,16,24,32, kHz), sur 21 souris contrôles (tout au long des 16 semaines de suivi) et sur 14 souris traitées STZ₂₀₀ sur un suivi de 56j et uniquement de 8 souris traitées à 16 semaines.

En abscisse, temps après injection de STZ en jours En ordonnée latence de l'onde en millisecondes.

Latences de l'onde I

Les graphiques montrent que la majorité des souris traitées présentent une latence d'onde I identique à celle déterminée pour les animaux contrôles. Néanmoins, pour quelques souris traitées (près de la moitié) aucune onde I n'a pu être visualisées et ce sur les fréquences de 24 et 32 kHz à partir de 8 semaines post-injection STZ₂₀₀. Pour ces mêmes souris traitées, la latence de leur onde I présente une légère augmentation croissante à la fréquence de 16kHz, et une augmentation croissante plus marquée aux fréquences de 8 et 10kHz.

Pour les fréquences de 8, 10 et 16 kHz, la variabilité inter-individuelle est très peu marquée pour la latence de l'onde I. Néanmoins, pour les fréquences de 24 et 32 kHz nous constatons que la latence de l'onde I présente une variabilité un peu plus marquée.

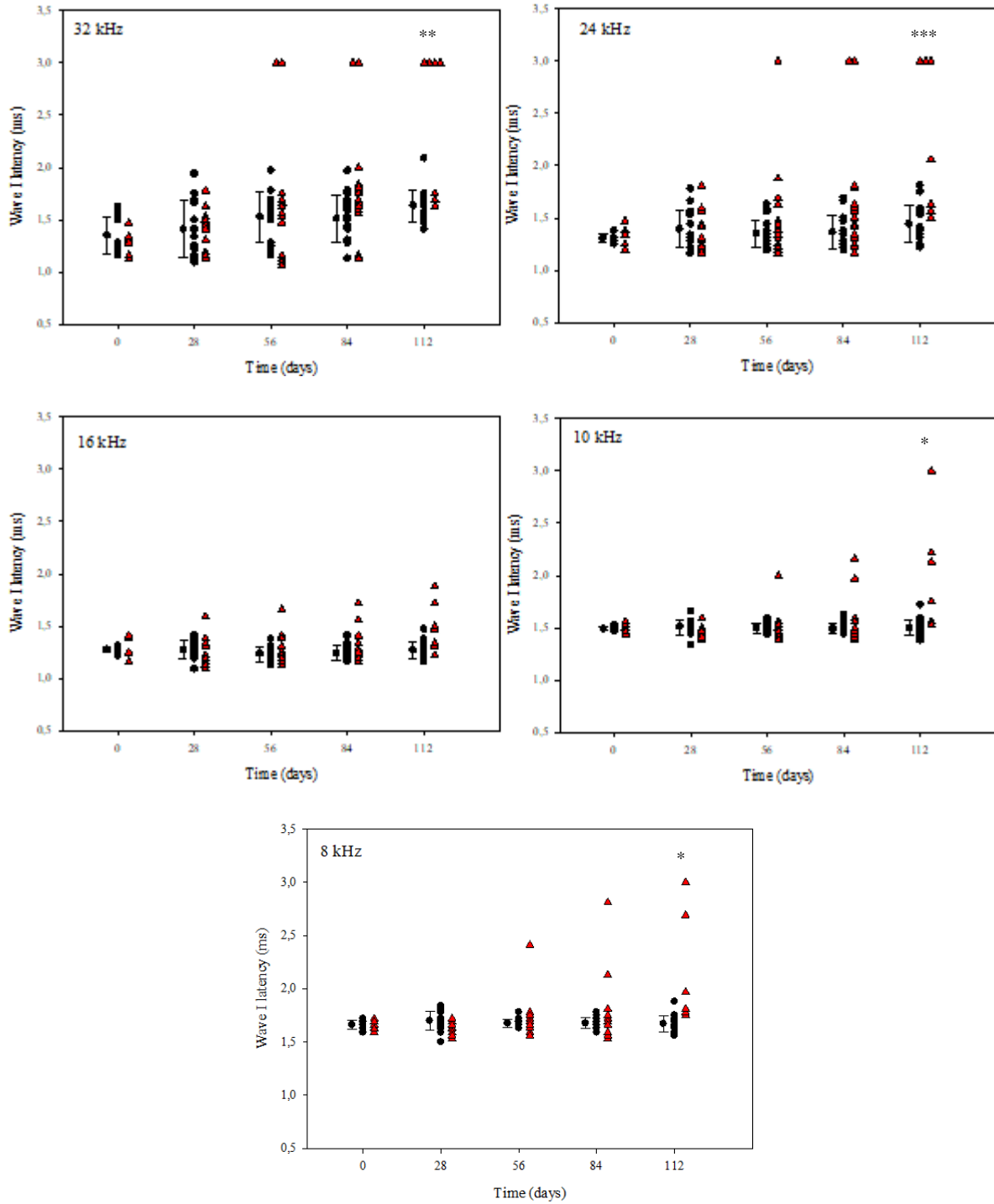


Figure 20 : Evaluation de la latence de l'onde I suite à l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ.

La détermination de la latence de l'onde I, pour les fréquences de 8, 16, 24 et 32 kHz, a été réalisé pendant 16 semaines après l'administration par une injection unique d'une dose de streptozotocine à la dose de 200mg/kg.

Les données individuelles sont représentées, et données moyennées (moyenne \pm écart type) sont représentées uniquement pour les animaux contrôles.

T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Taille des groupes : souris contrôles C57Bl/6JrJ (n=21), souris C57Bl/6JrJ STZ 200 mg/kg (n₁₀= 14, n_{28j}= 14, n_{56j}= 14, n_{84j}= 14, n_{112j}= 8)

Latences de l'onde III

Le profil d'évolution de la latence de l'onde III est similaire à l'évolution de l'onde I. Cependant, il apparaît très clairement que la latence de l'onde III pour les animaux traitées STZ₂₀₀ présente une dispersion vers des valeurs de latence plus importante, et ceci de façon plus marquée encore une fois sur les fréquences de 24 et 32 kHz. Pour un peu moins de la moitié des animaux traitées STZ₂₀₀ au niveau des fréquences 8 et 10 kHz et surtout à 16 semaines post-injection, nous retrouvons également une augmentation plus marquée de la latence de l'onde III.

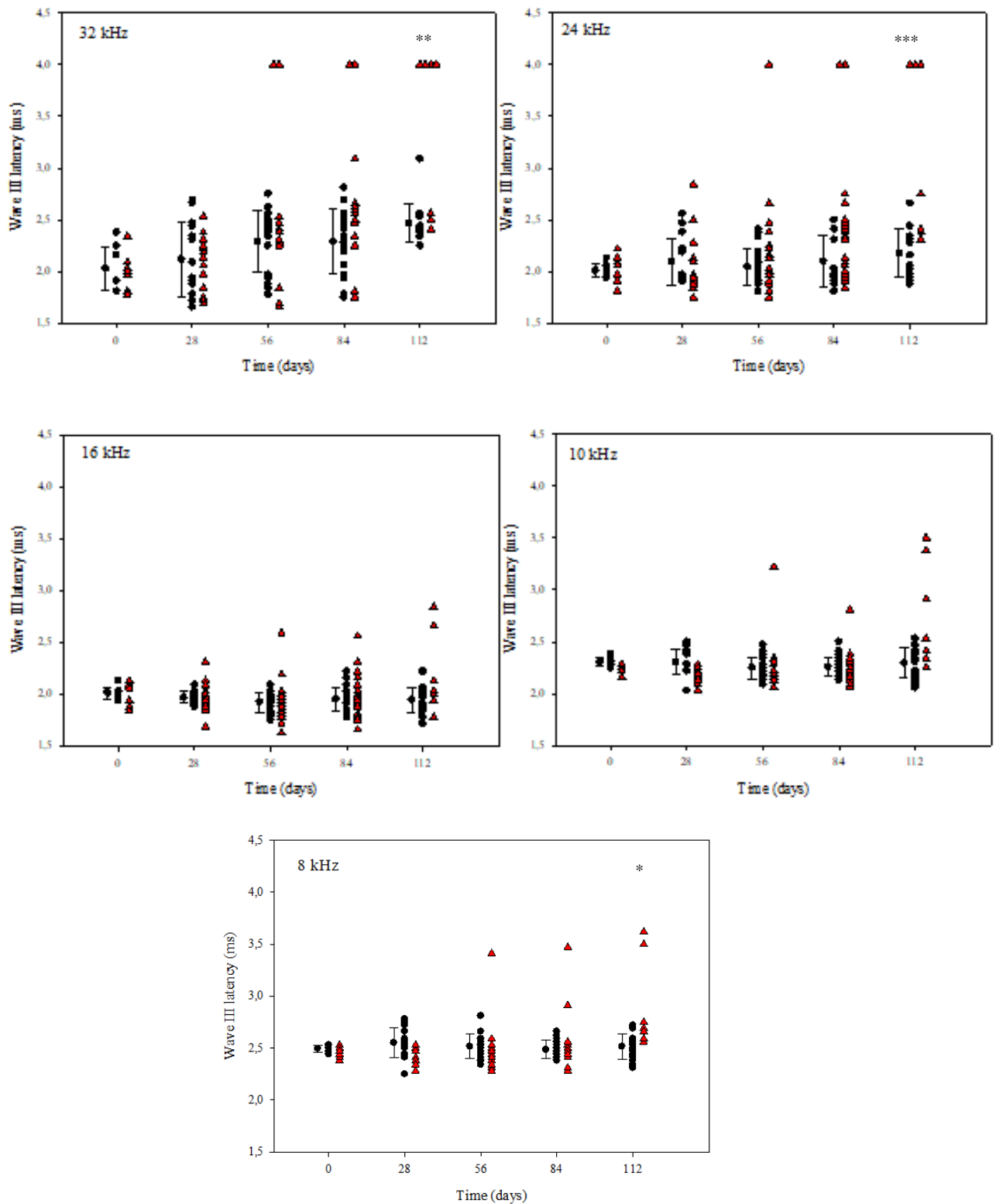


Figure 21 : Evaluation de la latence de l'onde III suite à l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ.

La détermination de la latence de l'onde III, pour les fréquences de 8, 16, 24 et 32 kHz, a été réalisé pendant 16 semaines après l'administration par une injection unique d'une dose de streptozotocine à la dose de 200mg/kg.

Les données individuelles sont représentées, et données moyennées (moyenne \pm écart type) sont représentées uniquement pour les animaux contrôles.

T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Taille des groupes : souris contrôles C57Bl/6JrJ (n=21), souris C57Bl/6JrJ STZ 200 mg/kg (n₁₀= 14, n_{28j}= 14, n_{56j}= 14, n_{84j}= 14, n_{112j}= 8)

Latences de l'onde V

Les évolutions de latence des ondes I et III se répercutent sur la latence de l'onde V. Ainsi, les mêmes constatations de dispersion des valeurs individuelles sont plus marquées dès la 12^{ème} semaine post-injection STZ₂₀₀ pour la fréquence de 32 kHz.

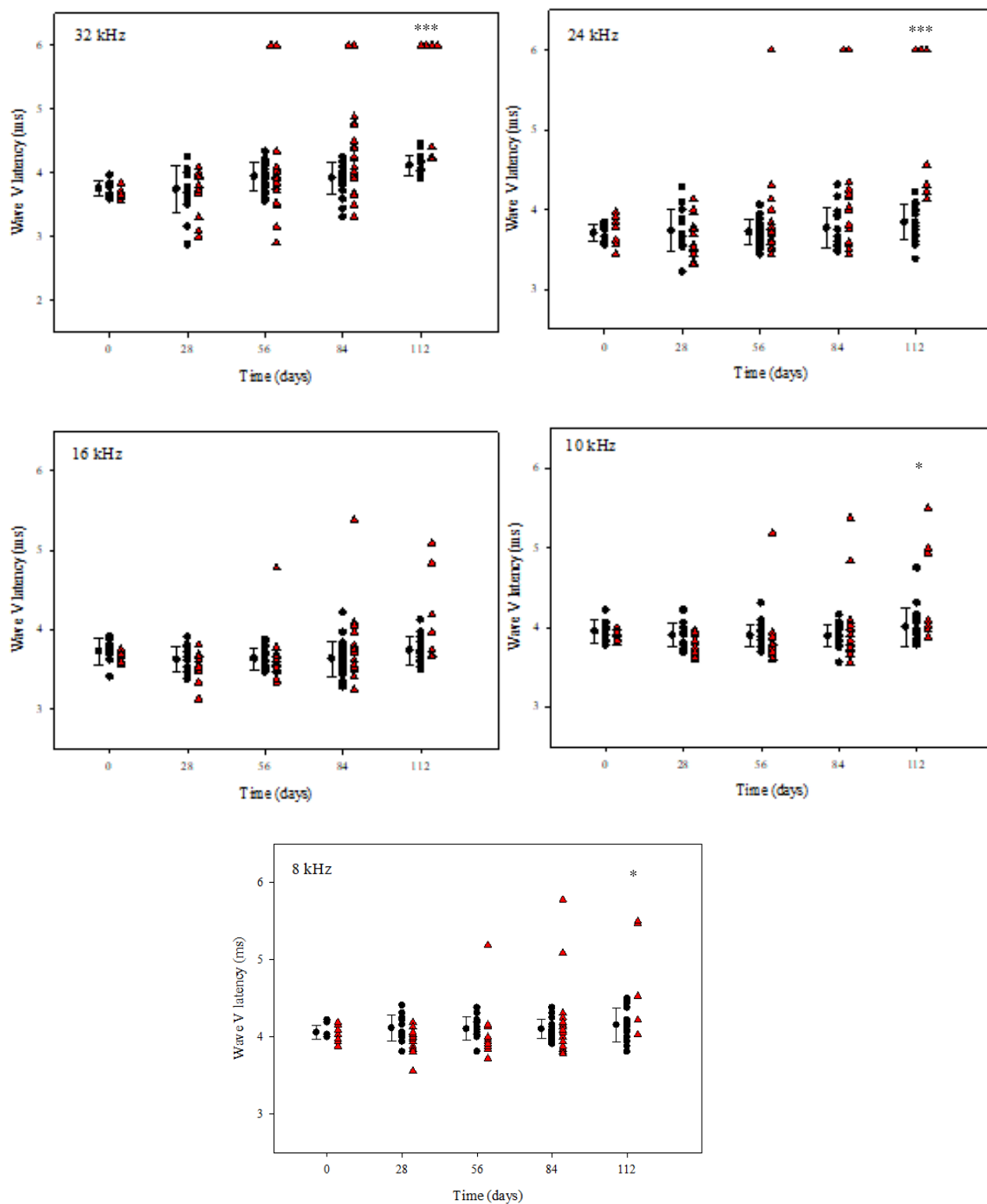


Figure 22 : Evaluation de la latence de l'onde V suite à l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ.

La détermination de la latence de l'onde V, pour les fréquences de 8, 16, 24 et 32 kHz, a été réalisé pendant 16 semaines après l'administration par une injection unique d'une dose de streptozotocine à la dose de 200mg/kg.

Les données individuelles sont représentées, et données moyennées (moyenne \pm écart type) sont représentées uniquement pour les animaux contrôles.

T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Taille des groupes : souris contrôles C57Bl/6JrJ (n=21), souris C57Bl/6JrJ STZ 200 mg/kg (n_{t0}= 14, n_{28j}= 14, n_{56j}= 14, n_{84j}= 14, n_{112j}= 8)

C) Analyse histologique de cochlée

A l'aide la coloration hématoxyline et éosine, des coupes fines de cochlées (7 μ m - en inclusion paraffine) d'animaux contrôles et traités STZ₂₀₀ ont été observées au microscope optique (grossissement x40) avec un examen focalisé sur la région du canal de Rosenthal contenant les corps cellulaires des ganglions spiraux. Le dénombrement des corps cellulaires des ganglions spiraux selon une surface délimitée a permis de déterminer une densité pour les étages basaux, médiaux et apicaux de cochlées d'animaux contrôles et traités STZ₂₀₀.

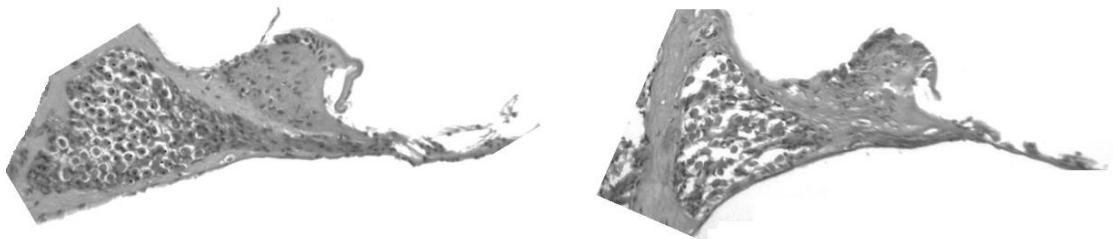


Figure 23 : Coupe histologique d'organe de Corti suite à l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ.

Coupes fines (7 μ m, inclusion paraffine, coloration hématoxyline et éosine) de cochlée au niveau du tour médian d'une souris contrôle C57Bl/6JrJ (image de droite) et d'une souris C57Bl/6JrJ traitée STZ₂₀₀ (à gauche) 16 semaines post-injection.

La densité des corps cellulaires des ganglions spiraux (GS) est identique (aucune différence significative) pour les animaux du groupe contrôle C57Bl/6JrJ quel que soit l'étage cochléaire

analysé ($GS_{\text{apical-ctl}} = 5,65 \pm 0,1 \cdot 10^{-3}/\mu\text{m}^2$, $GS_{\text{médian-ctl}} = 5,76 \pm 0,06 \cdot 10^{-3}/\mu\text{m}^2$, $GS_{\text{basal-ctl}} = 5,66 \pm 0,09 \cdot 10^{-3}/\mu\text{m}^2$).

Pour les animaux C57Bl/6JrJ traités STZ200 16 semaines post-injection il y a une différence significative de la densité des corps cellulaires des GS comparativement aux densités pour les animaux contrôles C57Bl/6JrJ ($GS_{\text{apical-STZ200}} = 3,93 \pm 0,08 \cdot 10^{-3}/\mu\text{m}^2$, $GS_{\text{médian-STZ200}} = 4,29 \pm 0,07 \cdot 10^{-3}/\mu\text{m}^2$, $GS_{\text{basal-STZ200}} = 4,23 \pm 0,09 \cdot 10^{-3}/\mu\text{m}^2$, T-test Student *** $P < 0.001$). De plus, pour les animaux C57Bl/6JrJ traités STZ₂₀₀, l'étage apical présente une densité des GS significativement plus faible comparativement aux étages médian (Mann-Whitney Rank Sum Test *** $P < 0.001$) et basal (Mann-Whitney Rank Sum Test * $P < 0.05$).

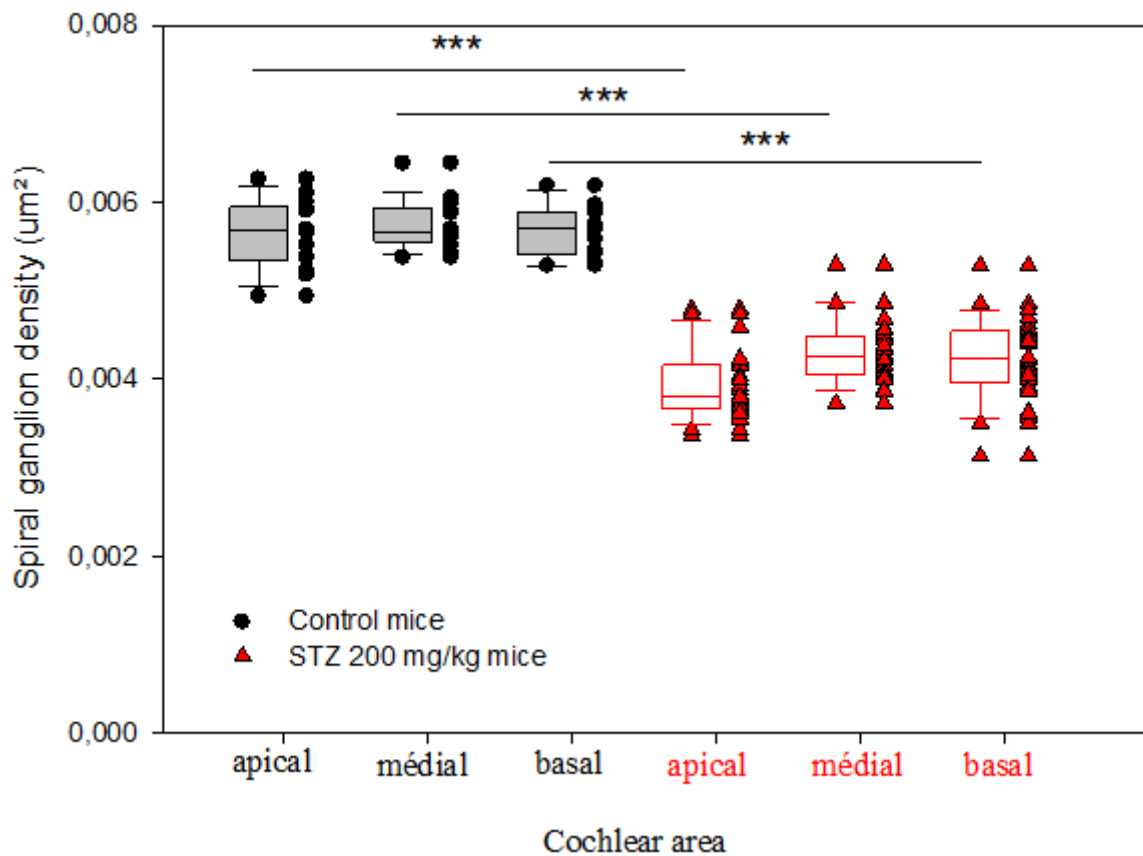


Figure 24 : Détermination de la densité des ganglions spiraux suite à l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ.

Les données de densité des ganglions spiraux pour les étages apicaux, médians, basaux sont représentées en boxplot pour les souris contrôle C57Bl/6JrJ sur un lot de 5 souris (boxplot en noir, $n_{\text{apical-ctl}} = 14$ coupes, $n_{\text{médian-ctl}} = 17$ coupes, $n_{\text{basal-ctl}} = 11$ coupes) et pour les souris C57Bl/6JrJ traitée STZ₂₀₀ sur un lot de 6 souris (boxplot en rouge, $n_{\text{apical-STZ200}} = 24$, $n_{\text{médian-STZ200}} = 29$, $n_{\text{basal-STZ200}} = 29$) 16 semaines post-injection.

T-test Student *** $P < 0.001$

Conclusion de l'étude de l'impact d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la fonction auditive périphérique chez des souris de souche C57Bl/6JrJ

La souche de souris C57Bl/6JrJ est connue pour présenter une dégradation précoce (dès le 2^{ème} mois de vie) et progressive de sa fonction auditive périphérique.

Après avoir induit une hyperglycémie pathologique rapide (installation en 48h) et stable (sur 16 semaines de suivi), nous avons constaté que les animaux C57Bl/6JrJ traités STZ₂₀₀ présentent une accélération de la dégradation de leur fonction auditive périphérique. Ceci est particulièrement visible sur les seuils auditifs acoustiques et électrophysiologiques.

Il est également important de souligner que les réponses inter-individuelles -tant chez les animaux contrôles que les animaux traités- présentent une grande variabilité. Ceci pourrait être en accord avec les observations cliniques chez l'Homme et l'hétérogénéité des expressions pathologiques.

Les images histologiques sont en accord avec les évaluations fonctionnelles auditives et laissent apparaître des pertes cellulaires au niveau de l'organe de Corti (disparition des cellules ciliées externes et internes).

Par ailleurs, l'analyse des réponses électrophysiologiques montrent une dégradation de la morphologie des ondes avec une augmentation de leurs latences. Ceci suggère qu'en plus de l'atteinte purement cochléaire (au niveau de l'organe de Corti) l'hyperglycémie pathologique induite entraîne une atteinte des fibres nerveuses auditives périphériques.

Il y a donc en parallèle de l'accélération de la dégradation de leur fonction auditive périphérique une neuropathie auditive.

Ce constat physiopathologique fonctionnel est attesté par une perte des ganglions spiraux chez les animaux C57Bl/6JrJ traités STZ₂₀₀.

II) Protocole n°2

Etude de l'impact d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la fonction auditive périphérique chez des souris de souche CBA/JrJ

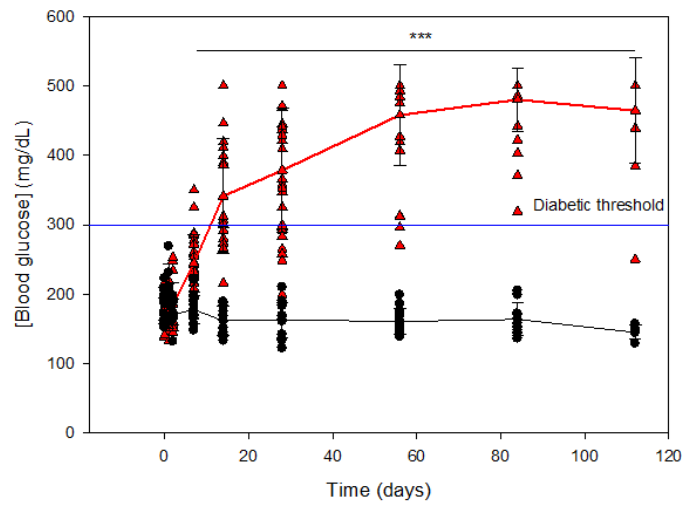
Induction syndrome métabolique hyperglycémique sur la souche CBA/JrJ

Dans le cadre de l'étude 1, qui a porté sur la mise au point d'un modèle de syndrome métabolique hyperglycémique sur la souche CBA/JrJ, nous avons ainsi pu établir un protocole qui induit une hyperglycémie pathologique (installation en 2 semaines) et stable (sur 16 semaines de suivi).

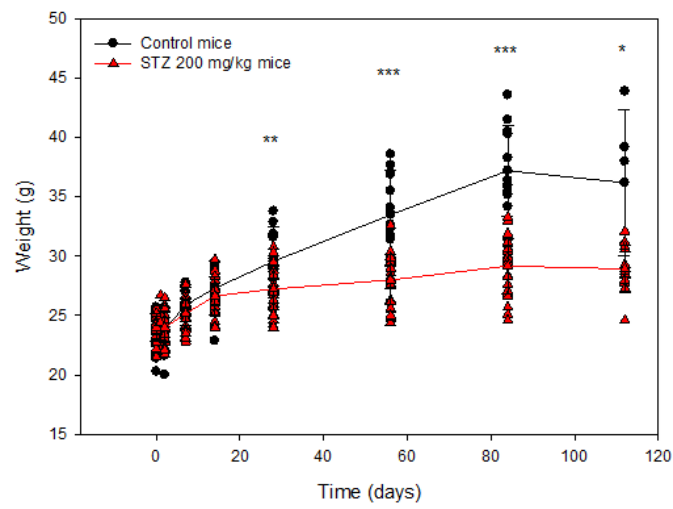
Nous avons ainsi constitué un groupe contrôle de 13 souris mâles CBA/JrJ, et un groupe de 28 souris mâles CBA/JrJs traitées STZ₂₀₀. Lors de l'administration de la STZ₂₀₀, toutes les souris CBA/JrJ étaient âgées de 6 semaines. Toutes les explorations fonctionnelles auditives (DPOAE et PEAp) ont été réalisées sous anesthésie générale gazeuse (isoflurane 4% lors de l'induction puis 1,5% lors du maintien) avec monitoring et maintien de la température corporelle.

Les graphiques suivants – évolutions du taux de glycémie, du poids corporel, de la vitesse de conduction neurale - illustrant l'impact de l'administration de STZ₂₀₀ présentent les caractéristiques identiques comme précédemment décrites dans la première étude de l'installation d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la souche CBA/JrJ.

A



B



C

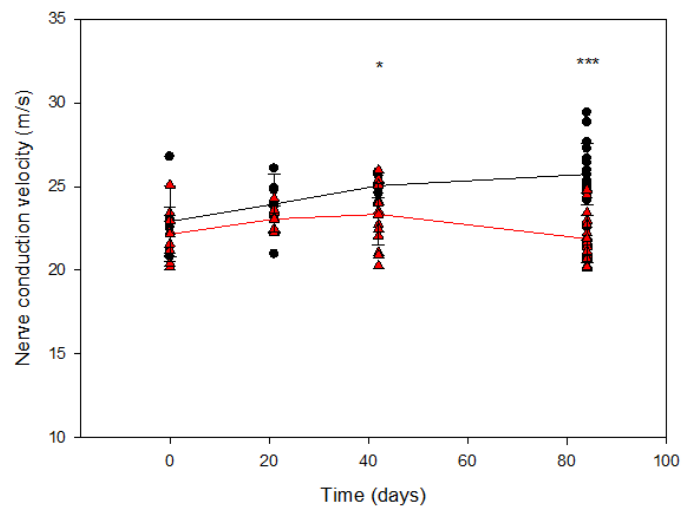


Figure 25 : Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris CBA/JrJ.

La mesure du taux de glycémie (panel A), du poids corporel (panel B) et de la vitesse de conduction nerveuse caudale (panel C) ont été réalisées pendant 16 semaines après l'administration par une injection unique d'une dose de streptozotocine à la dose de 200mg/kg. Les données moyennées (moyenne \pm écart type) et les données individuelles sont représentées.

T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Taille des groupes : souris contrôles CBA/JrJ (n=13), souris CBA/JrJ STZ 200 mg/kg (n=28).

A) Etude des Produits de distorsion acoustiques

Seuils auditifs acoustiques

Comme pour l'étude sur la souche C57Bl/6JrJ, à l'aide d'un protocole de présentation de stimuli de différentes fréquences à différentes intensités (8, 12, 16, 24 et 32 kHz entre 20 et 70 dB SPL), nous avons déterminé (pour chaque souris) un seuil auditif acoustique correspondant à une émergence de la réponse des PDA au minimum de 7 dB au-dessus du bruit de fond.

L'étude des seuils auditifs acoustiques sur les 5 fréquences étudiées (8, 12, 16, 24 et 32 kHz) ne révèle pas de différence significative entre les souris CBA/JrJ traitées STZ₂₀₀ comparativement aux souris contrôles CBA/JrJ et ceci tout au long des 16 semaines de suivi.

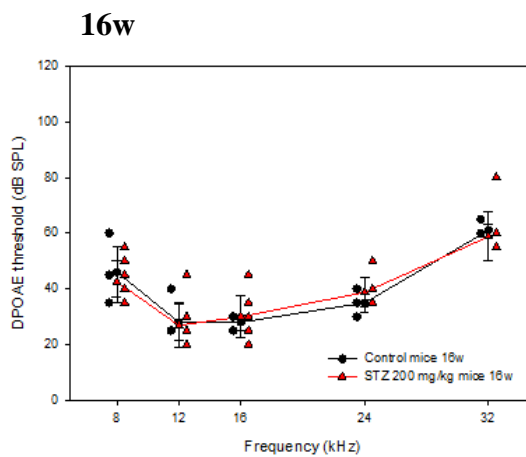
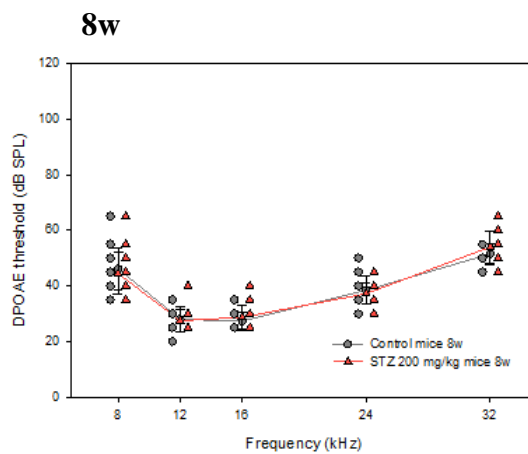
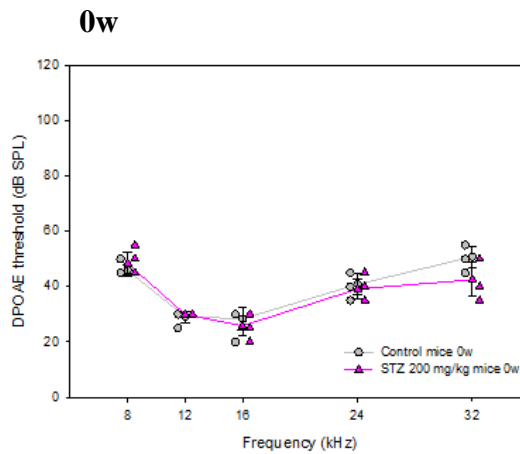


Figure 26 : Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris CBA/JrJ sur les produits de distorsion acoustiques.

Les données moyennées et les données individuelles des seuils auditifs acoustiques sont représentées pour 3 temps de suivi post-injection STZ₂₀₀ (avant, 8 et 16 semaines de suivi) pour les fréquences de 8, 12, 16, 24 et 32 kHz.

T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Taille des groupes : souris contrôles CBA/JrJ (n=13), souris CBA/JrJ STZ 200 mg/kg (n=28).

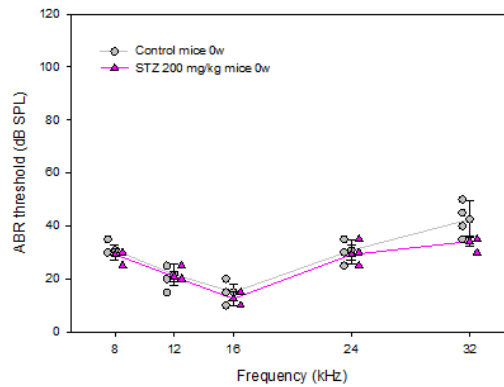
B) Etudes des Potentiels évoqués auditifs précoces

a) Seuils auditifs électrophysiologiques

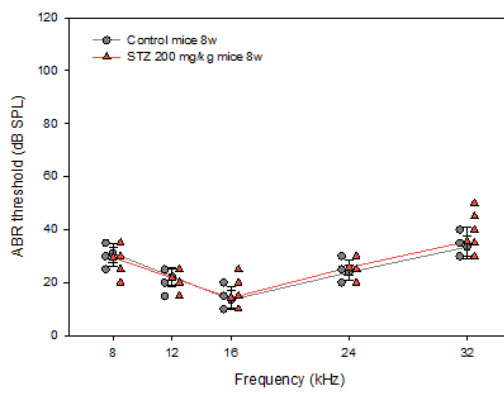
A l'aide d'un protocole de présentation de stimuli de différentes fréquences à différentes intensités (8, 12, 16, 24 et 32 kHz entre 10 et 100 dB SPL), nous avons -pour chaque souris- déterminer un seuil auditif électrophysiologique, des latences et amplitudes des ondes I III et V. La détermination du seuil correspond la plus petite intensité de stimulation permettant de visualiser l'émergence de l'onde I (avec une reproductibilité sur 2 courbes mesurées de façon successive).

L'étude des seuils auditifs électrophysiologiques sur les 5 fréquences étudiées (8, 12, 16, 24 et 32 kHz) ne révèle pas de différence significative entre les souris CBA/JrJ traitées STZ₂₀₀ comparativement aux souris contrôles CBA/JrJ et ceci tout au long des 16 semaines de suivi.

0w



8w



16w

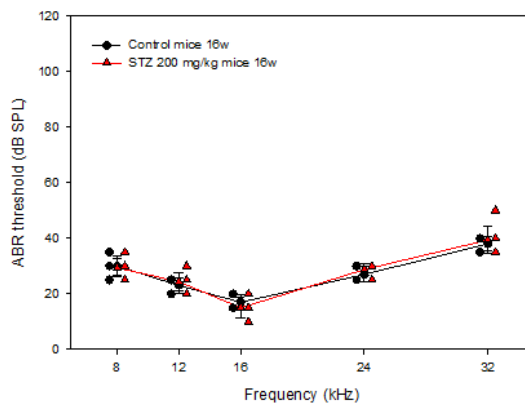


Figure 27 : Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris CBA/JrJ sur les potentiels évoqués auditifs précoces.

Les données moyennées et les données individuelles des seuils auditifs électrophysiologiques sont représentées pour 3 temps de suivi post-injection STZ₂₀₀ (avant, 8 et 16 semaines de suivi) pour les fréquences de 8, 12, 16, 24 et 32 kHz.

T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Taille des groupes : souris contrôles CBA/JrJ (n=13), souris CBA/JrJ STZ 200 mg/kg (n=28).

b) Comparaison seuils auditifs acoustiques et électrophysiologiques

Les graphiques illustrent très clairement la superposition des seuils auditifs acoustiques et électrophysiologiques entre les 2 groupes d'animaux contrôles CBA/JrJ et traités CBA/JrJ pour les fréquences de 8, 16, 24 et 32 kHz, avant et 16 semaines post-injection STZ₂₀₀.

La souche CBA/JrJ, avec ou sans administration de STZ₂₀₀, ne présente aucune installation de dégradation de sa fonction auditive.

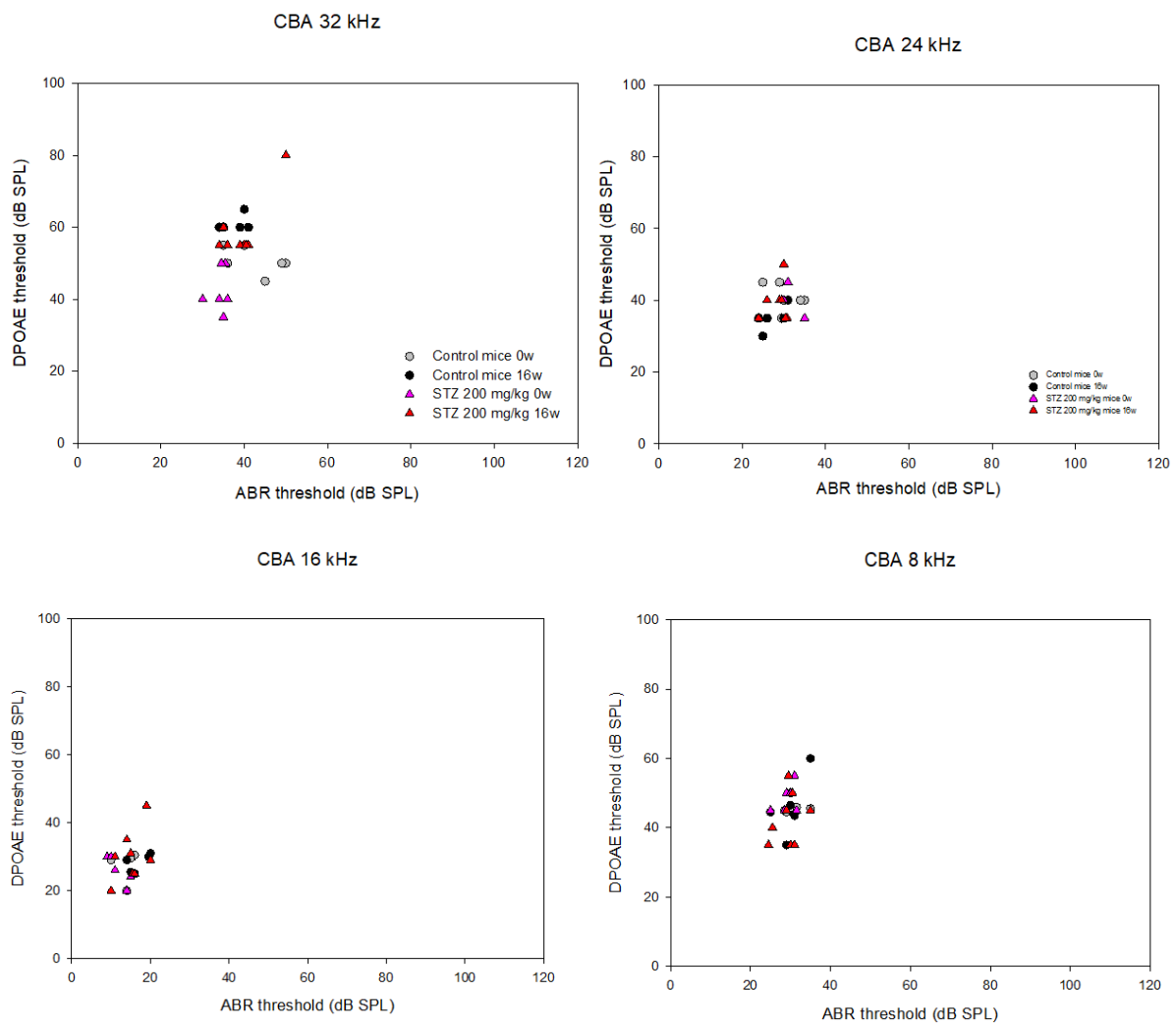


Figure 28 : Evaluation de l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ sur les potentiels évoqués auditifs précoces et les produits de distorsion acoustiques.

Les données individuelles des seuils auditifs électrophysiologiques et acoustiques sont représentées pour 2 temps de suivi post-injection STZ₂₀₀ (avant et 16 semaines de suivi) pour les fréquences de 8, 16, 24 et 32 kHz.

Taille des groupes : souris contrôles CBA/JrJ (n=13), souris CBA/JrJ STZ 200 mg/kg (n=28).

c) Latences des ondes I, II et V

Les latences des ondes I, II et V ont été déterminées sur des tracés de PEAp obtenus avec une intensité de présentation de 70 dB SPL pour chaque fréquence (8, 12, 16, 24, 32, kHz), sur 13 souris contrôles CBA/JrJ (tout au long des 16 semaines de suivi) et sur 15 souris CBA/JrJ traitées STZ₂₀₀ sur un suivi de 56j et uniquement de 8 souris CBA/JrJ traitées à 16 semaines. En abscisse, temps après injection de STZ en jours En ordonnée latence de l'onde en millisecondes.

Latences de l'onde I

L'étude de la latence de l'onde I sur les 5 fréquences étudiées (8, 12, 16, 24 et 32 kHz) ne révèle pas de différence significative entre les souris CBA/JrJ traitées STZ₂₀₀ comparativement aux souris contrôles CBA/JrJ et ceci tout au long des 16 semaines de suivi.

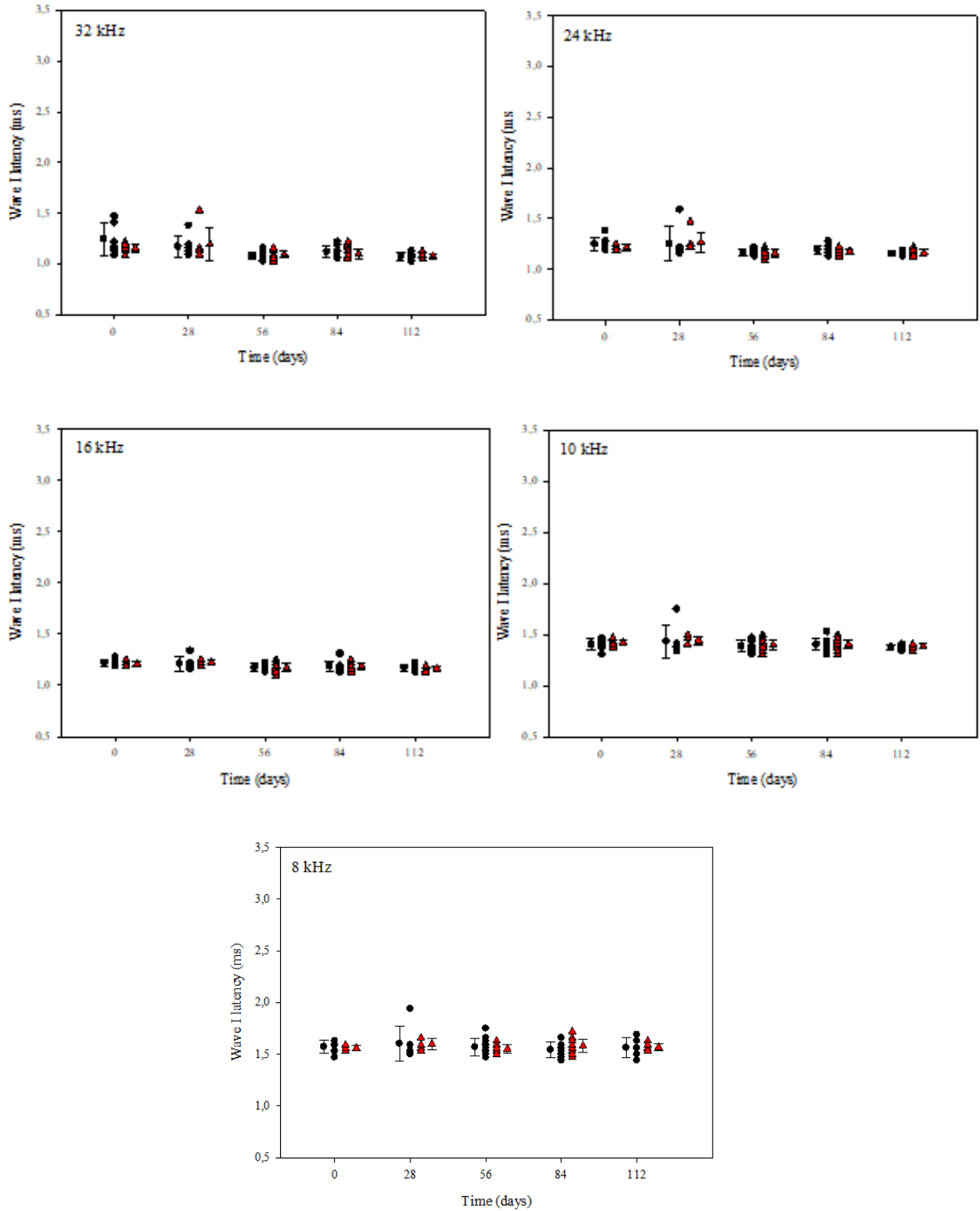


Figure 29 : Evaluation de la latence de l'onde I suite à l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris CBA/JrJ.

La détermination de la latence de l'onde I, pour les fréquences de 8, 16, 24 et 32 kHz, a été réalisé pendant 16 semaines après l'administration par une injection unique d'une dose de streptozotocine à la dose de 200mg/kg.

Les données individuelles sont représentées, et données moyennées (moyenne \pm écart type) sont représentées uniquement pour les animaux contrôles.

T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Taille des groupes : souris contrôles CBA/JrJ (n=13), souris STZ 200 mg/kg (n_{t0}= 15, n_{28j}= 15, n_{56j}= 15, n_{84j}= 15, n_{112j}= 8).

Latences de l'onde III

L'étude de la latence de l'onde III sur les 5 fréquences étudiées (8, 12, 16, 24 et 32 kHz) ne révèle pas de différence significative entre les souris CBA/JrJ traitées STZ₂₀₀ comparativement aux souris contrôles CBA/JrJ et ceci tout au long des 16 semaines de suivi.

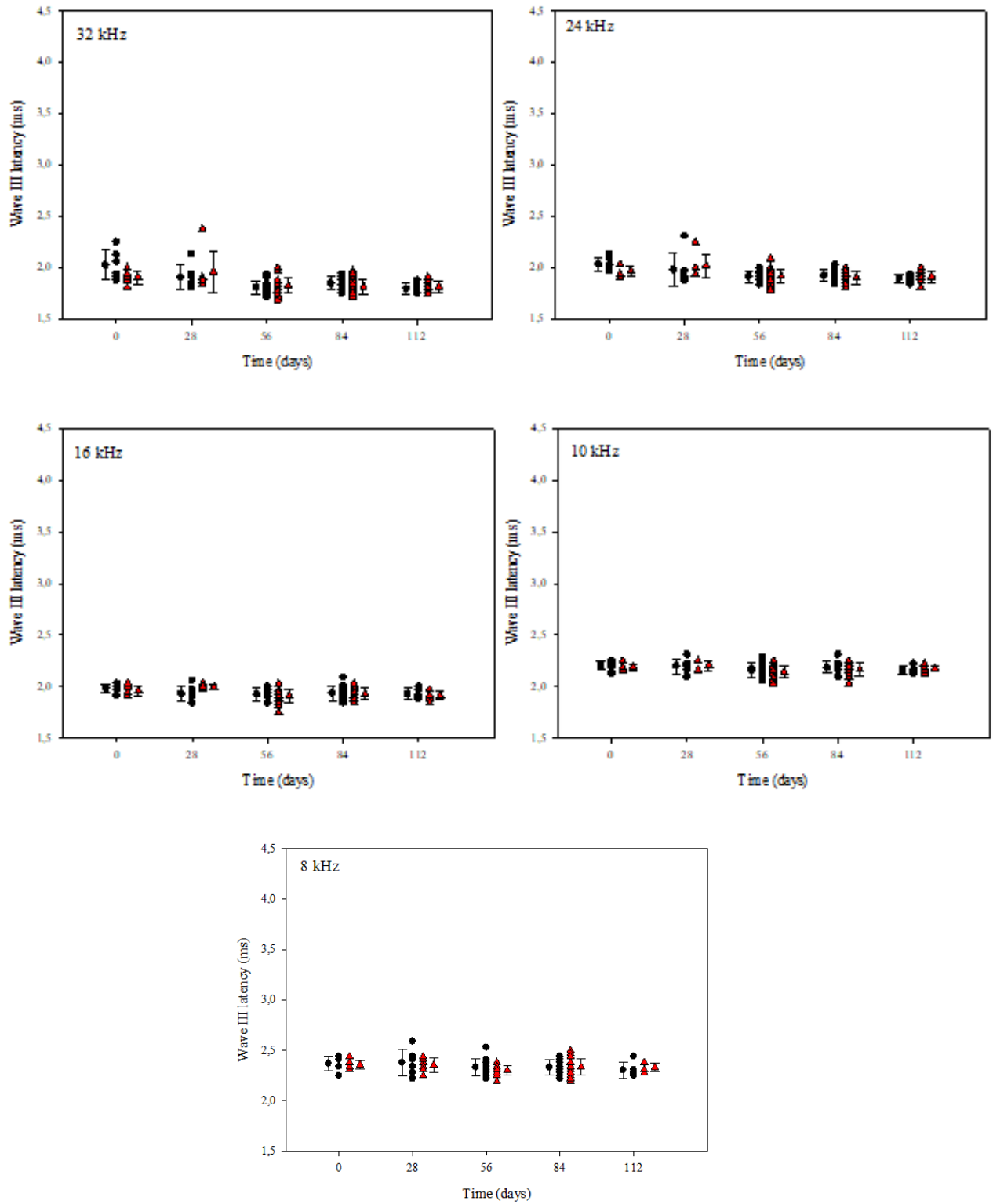


Figure 30 : Evaluation de la latence de l'onde III suite à l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris CBA/JrJ.

La détermination de la latence de l'onde III, pour les fréquences de 8, 16, 24 et 32 kHz, a été réalisé pendant 16 semaines après l'administration par une injection unique d'une dose de streptozotocine à la dose de 200mg/kg.

Les données individuelles sont représentées, et données moyennées (moyenne \pm écart type) sont représentées uniquement pour les animaux contrôles.

T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Taille des groupes : souris contrôles CBA/JrJ ($n=13$), souris STZ 200 mg/kg ($n_{t0}= 15$, $n_{28j}= 15$, $n_{56j}= 15$, $n_{84j}= 15$, $n_{112j}= 8$).

Latences de l'onde V

L'étude de la latence de l'onde V sur les 5 fréquences étudiées (8, 12, 16, 24 et 32 kHz) ne révèle pas de différence significative entre les souris CBA/JrJ traitées STZ₂₀₀ comparativement aux souris contrôles CBA/JrJ et ceci tout au long des 16 semaines de suivi.

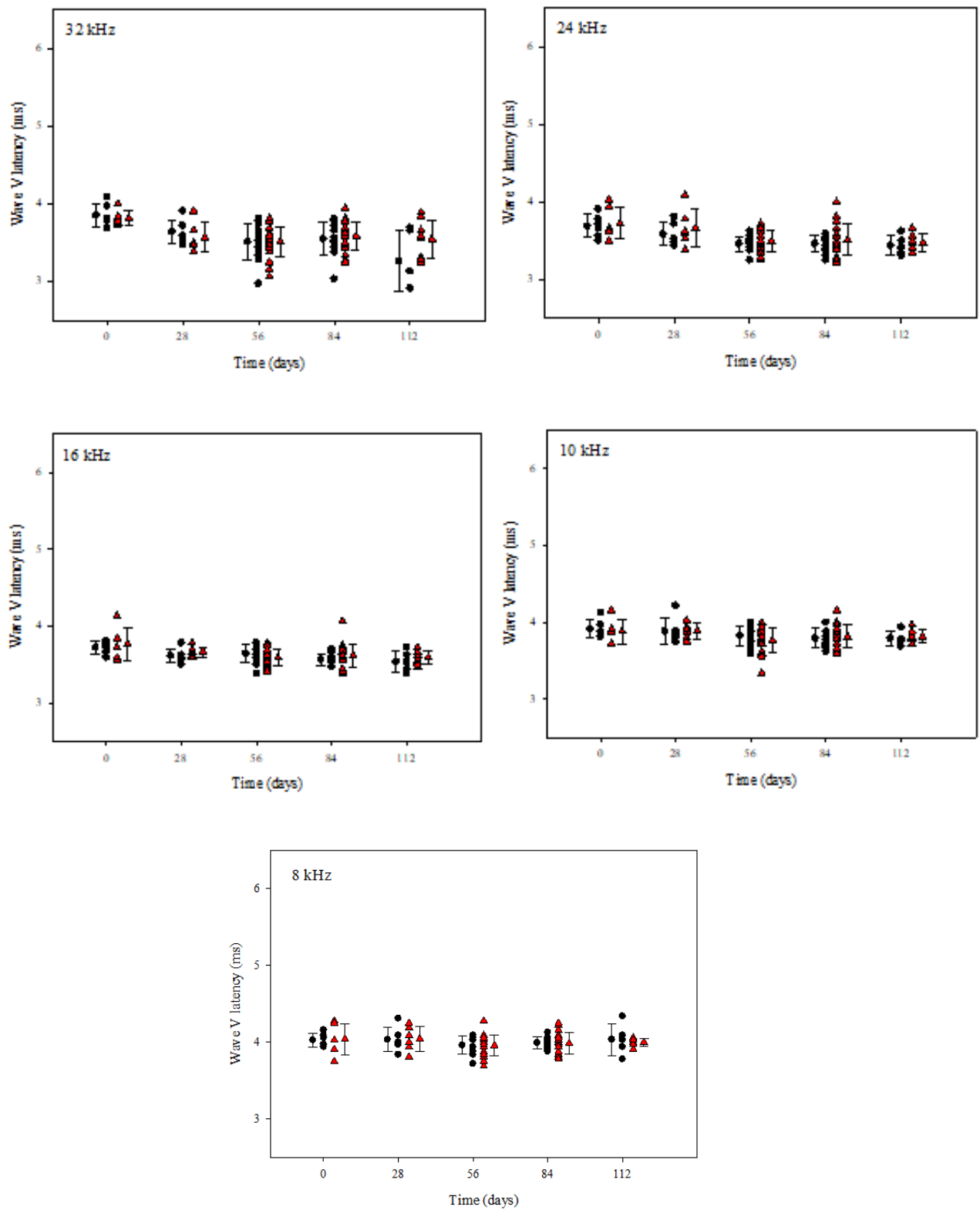


Figure 31 : Evaluation de la latence de l'onde V suite à l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris CBA/JrJ.

La détermination de la latence de l'onde V, pour les fréquences de 8, 16, 24 et 32 kHz, a été réalisé pendant 16 semaines après l'administration par une injection unique d'une dose de streptozotocine à la dose de 200mg/kg.

Les données individuelles sont représentées, et données moyennées (moyenne \pm écart type) sont représentées uniquement pour les animaux contrôles.

T-test Student Mann-Whitney Rank Sum Test *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Taille des groupes : souris contrôles CBA/JrJ (n=13), souris STZ 200 mg/kg (n_{t0}= 15, n_{28j}= 15, n_{56j}= 15, n_{84j}= 15, n_{112j}= 8).

C) Analyse histologique de cochlée

A l'aide la coloration hématoxyline et éosine, des coupes fines de cochlées (7 μ m - en inclusion paraffine) d'animaux contrôles et traités STZ₂₀₀ ont été observées au microscope optique (grossissement x40) avec un examen focalisé sur la région du canal de Rosenthal contenant les corps cellulaires des ganglions spiraux. Le dénombrement des corps cellulaires des ganglions spiraux selon une surface délimitée a permis de déterminer une densité pour les étages basaux, médiaux et apicaux de cochlées d'animaux contrôles et traités STZ₂₀₀.

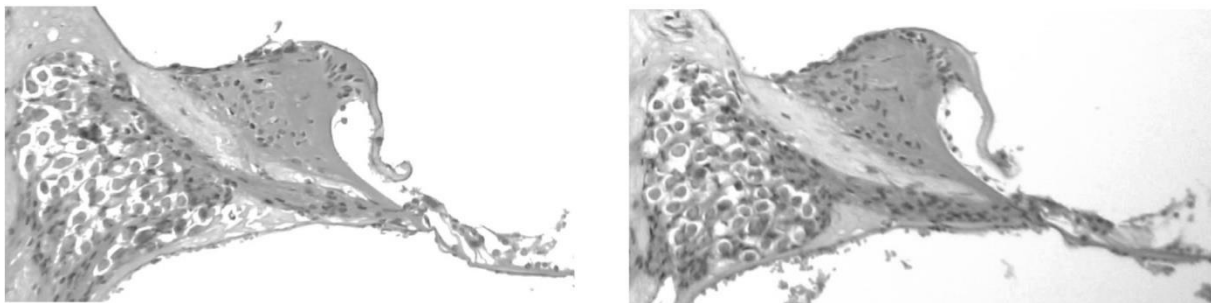


Figure 32 : Coupe histologique d'organe de Corti suite à l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris CBA/JrJ.

Coupes fines (7 μ m, inclusion paraffine, coloration hématoxyline et éosine) de cochlée au niveau du tour médian d'une souris contrôle CBA/JrJ (image de droite) et d'une souris CBA/JrJ traitée STZ₂₀₀ (à gauche) 16 semaines post-injection.

La densité des corps cellulaires des ganglions spiraux (GS) est identique (aucune différence significative) pour les animaux du groupe contrôle CBA/JrJ quel que soit l'étage cochléaire analysé ($GS_{\text{apical-ctl}} = 5,67 \pm 0,4 \cdot 10^{-3}/\mu\text{m}^2$, $GS_{\text{médian-ctl}} = 5,66 \pm 0,2 \cdot 10^{-3}/\mu\text{m}^2$, $GS_{\text{basal-ctl}} = 5,88 \pm 0,2 \cdot 10^{-3}/\mu\text{m}^2$).

Pour les animaux CBA/JrJ traités STZ200 16 semaines post-injection il y a une différence significative de la densité des corps cellulaires des GS comparativement aux densités pour les animaux contrôles ($GS_{\text{apical-STZ200}} = 4,97 \pm 0,8 \cdot 10^{-3}/\mu\text{m}^2$, $GS_{\text{médian-STZ200}} = 5,2 \pm 0,3 \cdot 10^{-3}/\mu\text{m}^2$, $GS_{\text{basal-STZ200}} = 5,04 \pm 0,3 \cdot 10^{-3}/\mu\text{m}^2$, T-test Student * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$).

Pour les animaux CBA/JrJ traités STZ₂₀₀, il n'y a aucune différence significative entre les 3 étages cochléaires.

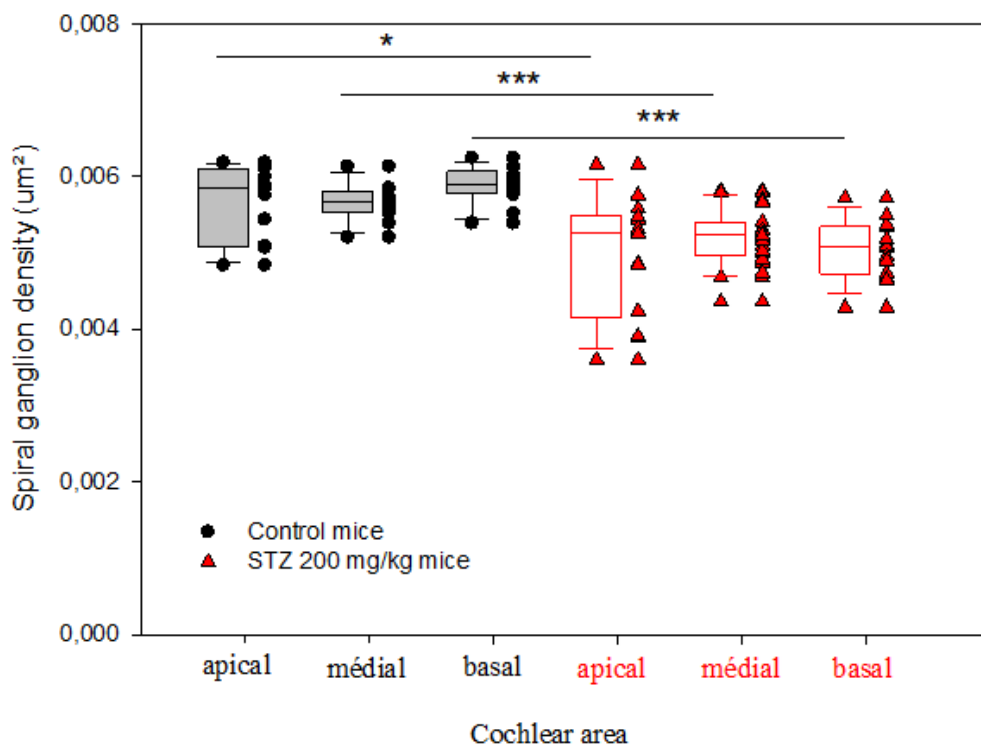


Figure 33 : Détermination de la densité des ganglions spiraux suite à l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris CBA/JrJ.

Les données de densité des ganglions spiraux pour les étages apicaux, médians, basaux sont représentées en boxplot pour les souris contrôle CBA/JrJ sur un lot de 4 souris (boxplot en noir, $n_{\text{apical-ctl}} = 11$, $n_{\text{médian-ctl}} = 12$, $n_{\text{basal-ctl}} = 13$) et pour les souris CBA/JrJ traitée STZ₂₀₀ sur un lot de 5 souris (boxplot en rouge, $n_{\text{apical-STZ200}} = 14$, $n_{\text{médian-STZ200}} = 21$, $n_{\text{basal-STZ200}} = 14$) 16 semaines post-injection.

T-test Student * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$

Conclusion de l'étude de l'impact d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la fonction auditive périphérique chez des souris de souche CBA/JrJ

La souche de souris CBA/JrJ est connue pour présenter une fonction auditive périphérique stable sur près de 2 ans de vie.

Nous avons confirmé la stabilité des seuils auditifs acoustiques et électrophysiologiques sur les 16 semaines de suivi des animaux CBA/JrJ contrôles et des animaux CBA/JrJ traités. L'administration de STZ₂₀₀ n'a pas induit de modification des seuils auditifs acoustiques et électrophysiologiques. L'analyse des réponses électrophysiologiques a également montré un maintien de la morphologie des ondes.

Les analyses fonctionnelles auditives laissent apparaître que l'hyperglycémie pathologique induite à l'aide de STZ₂₀₀ n'altère pas la fonction auditive périphérique et neurale sur la souche CBA/JrJ.

Si l'analyse des images histologiques n'a révélé aucune atteinte de l'organe de Corti (en accord avec les évaluations fonctionnelles auditives), néanmoins une diminution de la densité des ganglions spiraux (à tous les étages cochléaires) a été observée.

De façon surprenante, l'hyperglycémie pathologique induite entraînerait donc une neuropathie auditive périphérique « silencieuse », car sans altération fonctionnelle.

Etude n°3 - l'impact d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la fonction auditive centrale sur des modèles murins

L'étude 2 nous a conduit à conclure que l'hyperglycémie pathologique chez la souris de souche CBA/JrJ n'induisait pas d'altération fonctionnelle périphérique. Mais de façon surprenante et inattendue une neurodégénérescence a été observée au niveau de la densité des ganglions spiraux.

Cette constatation nous a conduit à l'interrogation d'une possible atteinte centrale induit par l'installation d'une l'hyperglycémie pathologique.

L'objectif de cette étude n°3 est d'examiner -par des approches électrophysiologiques- les éventuelles répercussions d'un syndrome métabolique hyperglycémique (induit par une injection de streptozotocine à 200mg/kg) sur la fonction auditive centrale chez 2 souches de souris : C57Bl/6JrJ et CBA/JrJ.

Protocole n°1

Etude de l'impact d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la fonction auditive centrale chez des souris de souche C57Bl/6JrJ

Nous avons ainsi constitué un groupe contrôle de 7 souris mâles C57Bl/6JrJ et un groupe de 12 souris mâles C57Bl/6JrJ traitées STZ₂₀₀.

Lors de l'administration de la STZ₂₀₀, toutes les souris C57Bl/6JrJ étaient âgées de 6 semaines. Les explorations électrophysiologiques centrales ont été réalisées sous anesthésie générale à l'aide d'une injection IP d'un mélange de kétamine et de xylazine avec monitoring et maintien de la température corporelle.

La mesure des potentiels évoqués auditifs de latence moyenne précoces nous permet d'évaluer de façon objective et non-invasive la fonction auditive centrale (réponses thalamo-sous corticales).

A l'aide d'un protocole de présentation de stimuli de différentes fréquences (10, 16, 24 kHz) à 80dB SPL, il est possible pour chaque souris de déterminer deux ondes annotées Na et Pa, dont la latence sera mesurée (avec une reproductibilité sur 3 courbes mesurées de façon successive). Pour supprimer le « facteur périphérique » (comme une augmentation de la latence de l'ondes I, II ou V) et pour étudier plus particulièrement la conduction centrale, nous avons analysé la latence entre ces deux ondes Na et Pa : l'interpic Na-Pa

Pour les souris C57Bl/6JrJ contrôles, pour chacune des 3 fréquences étudiées (10, 16, 24 kHz) aucune différence significative n'a été constaté pour les différents interpics NaPa tout au long des 3 points de suivi chronologiques à 8, 12 et 16 semaines post-injection STZ₂₀₀.

A 8 semaines post-injection STZ₂₀₀, les souris C57Bl/6JrJ traitées présentent une augmentation non significative l'interpic NaPa à la fréquence de 24 kHz. Pour les mesures effectuées à 12 et 16 semaines post-injection STZ₂₀₀, une grande variabilité des valeurs des interpics NaPa est constatée pour les 3 fréquences chez les souris C57Bl/6JrJ traitées. Une différence significative apparaît à 12 et 16 semaines pour la valeur de l'interpic NaPa_{24kHz} (NaPa_{24kHz-12semaines-STZ200} = 12,8 ± 0,8 ms, NaPa_{24kHz-12semaines-STZ200} = 13,6 ± 0,7 ms), et à 16 semaines pour la valeur de l'interpic NaPa_{16kHz} (NaPa_{16kHz-16semaines-STZ200} = 13,0 ± 0,9 ms,)

comparativement aux souris contrôles ($\text{NaPa}_{24\text{kHz-12semaines-ctl}} = 9,5 \pm 0,4 \text{ ms}$, $\text{NaPa}_{24\text{kHz-16semaines-ctl}} = 10,3 \pm 0,5 \text{ ms}$, $\text{NaPa}_{16\text{kHz-16semaines-ctl}} = 9,9 \pm 0,2 \text{ ms}$).

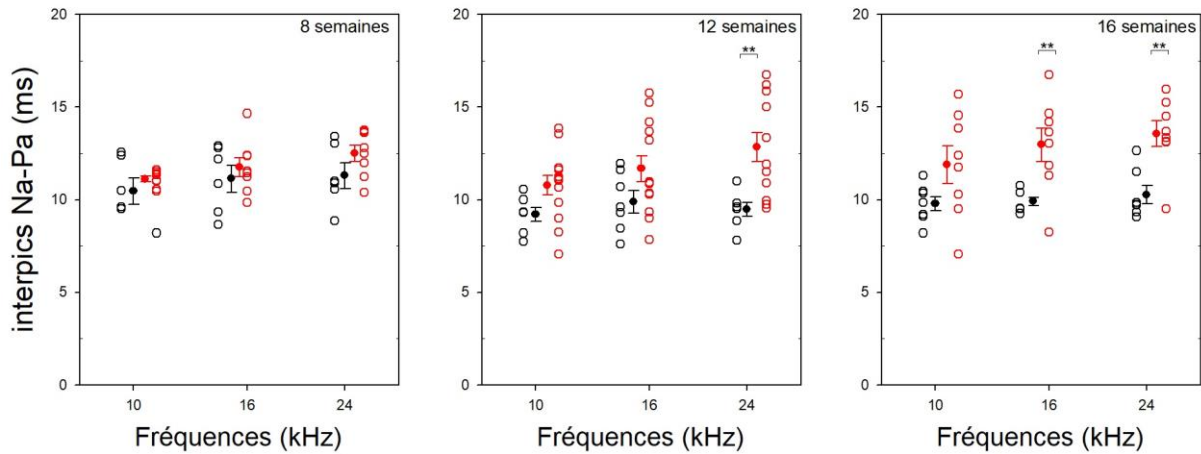


Figure 34 : Evaluation de la conduction centrale auditive suite à l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris C57Bl/6JrJ.

Les données moyennées (moyenne \pm écart type) et les données individuelles des interpauses NaPa sont représentées pour les 3 fréquences 10, 16 et 24 kHz pour 3 points de suivi post-injection STZ200 (8, 12 et 16 semaines).

T-test Student * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Taille des groupes : souris contrôles C57Bl/6JrJ (n=7), souris C57Bl/6JrJ STZ 200 mg/kg (n=12).

En plus de l'atteinte périphérique observée suite à l'administration de STZ₂₀₀, l'hyperglycémie pathologique chez la souris C57Bl/6JrJ est associée à une altération de la conduction centrale auditive à long terme (12-16 semaines post-injection).

Protocole n°2

Etude de l'impact d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la fonction auditive centrale chez des souris de souche CBA/JrJ

Nous avons ainsi constitué un groupe contrôle de 10 souris mâles CBA/JrJ et au maximum un groupe de 16 souris mâles CBA/JrJ traitées STZ₂₀₀ ($n_{8\text{semaines-STZ200}}= 8$ $n_{12\text{semaines-STZ200}}= 16$, $n_{16\text{semaines-STZ200}}= 12$). Lors de l'administration de la STZ₂₀₀, toutes les souris CBA/JrJ étaient âgées de 6 semaines.

Les potentiels évoqués auditifs de latence moyenne précoces pour les fréquences de 10, 16, 24 kHz (à 80dB SPL de présentation du stimulus) ont été réalisées sous anesthésie générale à l'aide d'une injection IP d'un mélange de kétamine et de xylazine avec monitoring et maintien de la température corporelle. Seul l'interpic NaPa est spécifiquement analysé.

Pour les souris CBA/JrJ contrôles, pour chacune des 3 fréquences étudiées (10, 16, 24 kHz) aucune différence significative n'a été constaté pour les différents interpics NaPa tout au long des 3 points de suivi chronologiques à 8, 12 et 16 semaines post-injection STZ₂₀₀.

D'une façon globale pour les souris CBA/JrJ traitées STZ₂₀₀, une grande variabilité des valeurs des interpics NaPa est observée avec une tendance à des valeurs plus importante comparativement à celles observées chez les souris CBA/JrJ contrôles.

A 8 semaines post-injection STZ₂₀₀, les souris C57Bl/6JrJ traitées présentent une augmentation non significative l'interpic NaPa à la fréquence de 24 kHz.

Pour les mesures effectuées à 8 et 16 semaines post-injection STZ₂₀₀, différence significative apparaît pour la valeur de l'interpic NaPa pour les 3 fréquences étudiées (10, 16 et 24 kHz) ($\text{NaPa}_{24\text{kHz-8semaines-STZ200}} = 12,3 \pm 0,8$ ms, $\text{NaPa}_{16\text{kHz-8semaines-STZ200}} = 11,6 \pm 0,8$ ms, $\text{NaPa}_{10\text{kHz-8semaines-STZ200}} = 12,0 \pm 0,7$ ms, $\text{NaPa}_{24\text{kHz-16semaines-STZ200}} = 14,1 \pm 0,6$ ms, $\text{NaPa}_{16\text{kHz-16semaines-STZ200}} = 13,4 \pm 0,6$ ms, $\text{NaPa}_{10\text{kHz-16semaines-STZ200}} = 12,6 \pm 0,7$ ms) comparativement aux souris contrôles ($\text{NaPa}_{24\text{kHz-8semaines-ctl}} = 9,8 \pm 0,3$ ms, $\text{NaPa}_{16\text{kHz-8semaines-ctl}} = 9,6 \pm 0,3$ ms,

NaPa_{10kHz-8semaines-ctl} = 9,9 ± 0,4 ms, NaPa_{24kHz-16semaines-ctl} = 9,3 ± 0,9 ms, NaPa_{16kHz-16semaines-ctl} = 9,3 ± 0,7 ms, NaPa_{10kHz-16semaines-ctl} = 10,1 ± 0,6 ms).

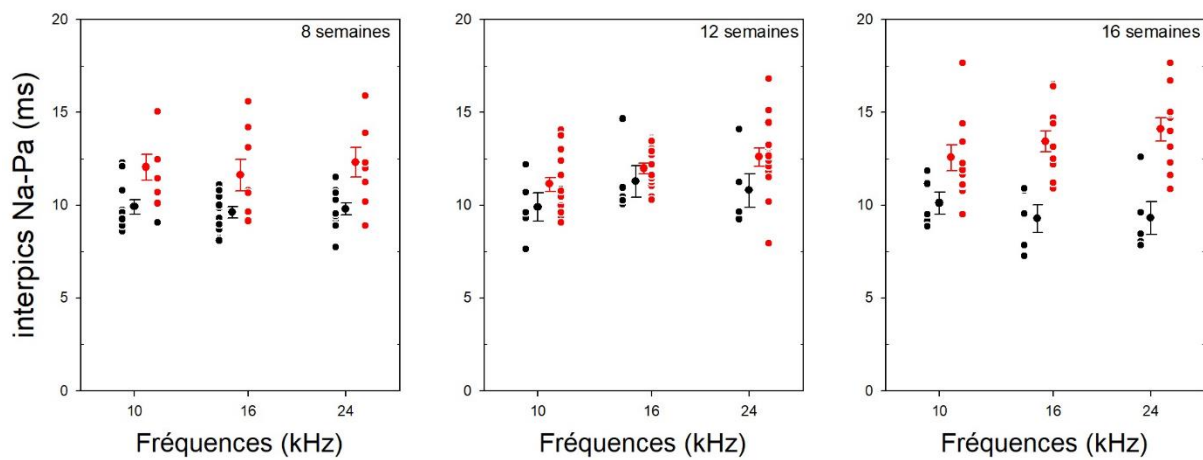


Figure 35 : Evaluation de la conduction centrale auditive suite à l'administration de la STZ à une dose de 200 mg/kg sur des souris CBA/JrJ.

Les données moyennées (moyenne ± écart type) et les données individuelles des interpics NaPa sont représentées pour les 3 fréquences 10, 16 et 24 kHz pour 3 points de suivi post-injection STZ200 (8, 12 et 16 semaines).

T-test Student *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Taille des groupes : souris contrôles CBA/JrJ (n=10), souris C57Bl/6JrJ STZ 200 mg/kg (n_{8semaines-STZ200}= 8 n_{12semaines-STZ200}= 16, n_{16semaines-STZ200}= 12).

Suite à l'administration de STZ₂₀₀, l'hyperglycémie pathologique chez la souris C57Bl/6JrJ entraine une neuropathie auditive périphérique « silencieuse » associée à une altération prononcée de la conduction centrale auditive à long terme (16 semaines post-injection).

Discussion Partie 2

Etudes 2 et 3 Etude de l'impact d'un SMH sur la fonction auditive

I) Souche C57Bl/6JrJ

Dans la littérature scientifique, les modèles animaux de souche C57Bl/6JrJ sont très utilisés dans le monde de l'audition ayant sa fonction auditive qui se dégrade dès le 2^e mois de vie (Zheng et al., 1999). Cependant cette souche est également très utilisée dans le monde de la recherche pour sa capacité à être facilement manipulable génétiquement. La plupart des modèles diabétiques inclut génétiquement sont issues de la souche C57Bl/6J (*Lepr^{db/db}*, *Lepr^{ob/ob}* ou Akita) et sont utilisées dans les études de l'impact du diabète sur la fonction auditive (Lyu et al., 2021 ; Lee et al., 2020 ; Han et al., 2018).

Leurs études ont montré que le diabète induisait une perte auditive d'origine vasculaire (atrophie de la strie vasculaire, microangiopathie cochléaire) avec ou sans atteinte neurale (dégénérescence des neurones du ganglion spiral, diminution des cellules ciliées) s'accompagnant d'une dysfonction mitochondriale.

Également, un modèle de STZ utilisant la souche C57Bl/6J, suggère une susceptibilité au trauma sonore pour les souris diabétiques avec un flux sanguin cochléaire réduit et une perte des neurones du ganglion spiral observées dans la cochlée des souris diabétiques après une exposition sonore (Fujita et al., 2012).

A) *Atteinte vasculaire*

Dans notre étude, les images histologiques sont en accord avec les évaluations fonctionnelles auditives (augmentation des seuils auditifs sur les hautes fréquences, augmentation de leurs latences sur les hautes fréquences à partir de 12 semaines après injection STZ 200 mg/kg) et laissent apparaître des pertes cellulaires au niveau de l'organe de Corti (disparition des cellules ciliées externes et internes, diminution du nombre de cellules du ganglion spiral). Ceci suggère qu'en plus de l'atteinte purement cochléaire (au niveau de l'organe de Corti) l'hyperglycémie pathologique induite chimiquement entraîne une atteinte des fibres nerveuses auditives périphériques. Ce constat physiopathologique fonctionnel est en accord avec ce qui a été montré dans la littérature.

Peu d'études utilisent des mesures acoustiques comme technique pour analyser une atteinte vasculaire, ils utilisent en priorité l'immunohistochimie ou l'histologie pour observer la structure de la paroi des vaisseaux (strie vasculaire pour l'organe de Corti). Cependant les produits de distorsion des émissions otoacoustiques renseignent sur la fonctionnalité des cellules ciliées externes mais également indirectement sur la vascularisation de la strie vasculaire avec les échanges ioniques avec l'endolymphe. Une atteinte de la strie vasculaire pourrait être représentée par une diminution de l'amplitude des réponses des otoémissions acoustiques. Cependant les otoémissions acoustiques ne révéleront que l'atteinte vasculaire du système auditif par le diabète. Pour hypothétiser sur une atteinte neurale, les potentiels évoqués auditifs précoces sont la technique pour montrer une atteinte neurale et quelle atteinte selon la latence des ondes ou la forme de l'onde. D'autres techniques auraient pu être utilisées par l'usage des otoémissions acoustiques transitoires qui serait plus sensible pour montrer un dysfonctionnement cochléaire (Ren al., 2021) ou la mesure du potentiel endocochléaire (mesure de l'environnement ionique de l'endolymphe) (Palbrink et al., 2020).

B) Atteinte neurale

D'un point de vue clinique, s'il s'agit uniquement d'une atteinte des CCE, il est possible d'imaginer que le patient diabétique ayant une telle perte auditive présente une baisse d'audition (perte auditive objectivée sur l'audiométrie, augmentation des seuils d'au moins 50dB HL, perte de réponses des otoémissions acoustiques, seuil PEA à 50dB, latences d'ondes PEA normales). Cela pourrait se traduire chez le patient diabétique par le besoin d'écouter la télévision plus fort, faire répéter les personnes pour un manque de compréhension. Cette atteinte serait une surdité neurosensorielle avec une dysfonction ou une perte de fonction de l'amplificateur cochléaire (CCE) (Wong et Ryan, 2015). La réhabilitation des personnes développant de telles surdités passe par un appareillage classique qui en principe est couronné de succès tant que les pertes auditives ne sont pas trop sévères.

S'il s'agit d'une perte des cellules du ganglion spiral conduisant à une neurodégénérescence, le patient aura (avec ou sans réelle perte auditive objectivée sur l'audiométrie) plus de difficulté de compréhension même si le message sonore ou de parole est présenté plus fort, car il manque un support pour faire la mécanotransduction ou le lien avec les fibres nerveuses. Cependant, il est désormais connu qu'un nombre croissant d'entités

physiopathologiques (désormais regroupées sous le chapeau de « spectre des neuropathies auditives ») sont associées à une perturbation de la conduction neurale auditive, conduisant à un tableau clinique caractéristique de troubles de l'audition (Starr et al. 1996, Giraudet & Avan 2012). Ainsi, la présence de seuils auditifs modérément élevés voire subnormaux (donc peu ou pas d'altérations au niveau de l'audiogramme) peut coexister dans certains cas avec une nette dégradation des performances de compréhension de la parole. Les patients expriment souvent une plainte typique : « j'entends, mais je ne comprends pas et surtout dans des situations bruyantes ». En effet, dans les étiologies des neuropathies auditives le diabète est souvent impliqué.

Dans les études cliniques sur les neuropathies auditives, ce sont souvent les fibres afférentes qui sont altérées avec une évaluation des PEAp. La neuropathie auditive englobe une série de mécanismes pathologiques qui perturbent généralement le codage synaptique et/ou la transmission neuronale de l'information auditive dans la cochlée et le nerf auditif. La synaptopathie auditive, qui altère le codage des sons au niveau des synapses entre les cellules ciliées internes et les neurones du ganglion spiral, résulte de défauts génétiques ou d'agressions telles que l'exposition à des bruits forts. Des tests physiologiques et psychophysiques avancés, combinés à une analyse génétique moléculaire, facilitent le diagnostic de la synaptopathie et de la neuropathie auditive. Bien que les aides auditives traditionnelles n'apportent souvent pas de bénéfice substantiel aux patients atteints de synaptopathie ou de neuropathie auditive, les implants cochléaires peuvent permettre une réhabilitation auditive efficace selon le(s) site(s) de la pathologie (Moser et Starr, 2016).

Dans certains cas, le système efférent rétrocontrôle de l'oreille interne peut être également atteint dans la neuropathie auditive. Dans une étude préliminaire - pilote de notre équipe, l'étude du système efférent laisse penser que les souris diabétiques présentaient une perte du réflexe stapédien. Cette étude consistait à réaliser des produits de distorsion des otoémissions acoustiques avec bruit blanc dans l'oreille controlatérale.

Dans le cas d'une neuropathie périphérique où le système efférent est atteint en premier, la solution est un message de prévention en clinique vis-à-vis des expositions sonores de loisir ou professionnelle avec bruit. Les études précliniques utilisant un trauma sonore ont montré une sensibilité plus marquée à une perte auditive avec une difficulté de récupération de la fonction auditive à un seuil normal chez des souris diabétiques par rapport aux souris contrôles (Lee et al., 2021 ; Han et al., 2018).

Dans une étude clinique, il a également été montré que le réflexe stapédien (action du système efférent lorsque la stimulation sonore est trop élevée) est moins présent sur une cohorte de patients diabétiques de type 2. La mesure du réflexe stapédien en clinique est assez simple et pourrait être un marqueur précoce de neuropathie auditive induite par le diabète (Giraudet et al., 2022).

Des stratégies de prévention tant sur le diabète que sur le versant de la neuroprotection peuvent être mis en place par la consommation d'anti-oxydants qui ralentissent la progression de la perte auditive sur des souris diabétiques. En effet, une des causes de la neuropathie auditive diabétique est la production de radicaux libres et d'espèces réactives à l'oxygène provoquée par l'hyperglycémie.

En plus de l'atteinte périphérique observée suite à l'administration de STZ₂₀₀, l'hyperglycémie pathologique chez la souris C57Bl/6JrJ est associée à une altération de la conduction centrale auditive à long terme (12-16 semaines post-injection). Cette observation n'a été que peu discuté (Hong et Kang, 2008) et confirme l'hypothèse du lien entre diabète et perte auditive par une neuropathie auditive diabétique.

III) Souche CBA/JrJ

Dans la littérature scientifique, très peu d'études existent sur l'utilisation de la souche CBA/JrJ dans la recherche sur le lien entre diabète et perte auditive sans confirmer que ce lien peut exister (Vasilyeva et al., 2009). Pourtant, la souche de souris CBA/JrJ est connue pour présenter une fonction auditive périphérique stable sur près de 2 ans de vie.

Dans notre projet, il a été confirmé la stabilité des seuils auditifs acoustiques et électrophysiologiques sur les 16 semaines de suivi des animaux CBA/JrJ contrôles et des animaux CBA/JrJ traités. L'administration de STZ à 200 mg/kg n'a pas induit de modification des seuils auditifs acoustiques et électrophysiologiques. L'analyse des réponses électrophysiologiques a également montré un maintien de la morphologie des ondes comme ce qui a pu être vu dans la littérature (Vasilyeva et al., 2009).

Les analyses fonctionnelles auditives laissent apparaître que l'hyperglycémie pathologique induite à l'aide de STZ à 200 mg/kg n'altère pas la fonction auditive périphérique et neurale sur la souche CBA/JrJ. Si l'analyse des images histologiques n'a révélé aucune atteinte de l'organe de Corti (en accord avec les évaluations fonctionnelles auditives),

néanmoins une diminution de la densité des ganglions spiraux (à tous les étages cochléaires) a été observée.

De façon surprenante, l'hyperglycémie pathologique induite entrainerait donc une neuropathie auditive périphérique « silencieuse », car sans montrer une altération fonctionnelle (seuils auditifs intacts).

Suite à l'administration de STZ à 200 mg/kg, l'hyperglycémie pathologique chez la souris CBA/JrJ entraîne une neuropathie auditive périphérique « silencieuse » associée à une altération prononcée de la conduction centrale auditive à long terme (16 semaines post-injection). Ce résultat est d'autant plus surprenant qu'il n'existe aucune littérature sur la neuropathie auditive traitant de ce cas de figure. Une atteinte du système auditif sans atteinte du système périphérique et avec des données électrophysiologiques normales n'a pas ou très peu été documenté. Il pourrait s'agir d'une lésion au niveau des fibres nerveuses après le colliculus inférieur (latence onde V normale). Cependant, la diminution de la densité des ganglions spiraux pourrait indiquer une dégénérescence au niveau des neurones de type 1 sans altération fonctionnelle. Cette hypothèse pourrait être montrée par une diminution de l'amplitude de l'onde 1 comme indiqué dans la littérature (Moser et Starr, 2016 ; Kujawa et Liberman, 2015). Dans la littérature, cette atteinte était liée à une exposition au bruit ou à un âge avancé. Aucune différence au niveau de l'amplitude de l'onde 1 de ces souris n'a été montrée que ce soit entre les groupes étudiés ou pour le groupe traité entre l'injection et 16 semaines post-injection.

Une autre hypothèse pourrait être le dysfonctionnement mitochondrial. Il a été montré qu'une dégénérescence précoce des mitochondries (6 mois) au niveau du système auditif central, avait pour conséquence une altération fonctionnelle visible que 6 mois après (1 an) (Youn et al., 2020). Cette hypothèse serait à étudier dans le cas de notre étude avec l'analyse de l'expression de gènes impliqués dans la voie de dégénérescence des mitochondries tels que *PINK1*, *Parkin*, et *BNIP3* au niveau du cortex auditif et du colliculus inférieur des souris. Cette dégénérescence mitochondriale pourrait être consécutive à la réaction inflammatoire provoquée par l'état diabétique avec la production de ROS.

Sur cette souche de souris, c'est la première fois qu'une telle observation est faite sur un modèle animal avec une audition réputée stable.

En clinique, une étude préliminaire au sein du laboratoire sur des patients de type 1 et de type 2, a montré que la latence et l'amplitude de l'onde P300 (PEA tardifs) était inchangée

chez les patients diabétiques de type 1 mais la latence de l'onde P300 était augmentée et l'amplitude significativement diminuée chez les patients diabétiques de type 2. Dans leurs cas, la réhabilitation auditive est quasiment impossible.

Réflexion personnelle

Le diabète est une maladie métabolique connue pour ses atteintes microangiopathiques (rétine, rein et nerfs) et macroangiopathiques (maladies cardiaques). Les atteintes auditives ne sont pas encore pertinentes dans le monde scientifique. Mais de plus en plus de campagnes de prévention voient le jour dans le monde notamment en Europe et aux Etats-Unis.

Les modèles animaux de neuropathie diabétique sont utilisés pour explorer la fonction auditive et les altérations occasionnés. Cependant, ces modèles ne reproduisent pas fidèlement la pathologie diabétique et il existera toujours des biais expérimentaux pour valider entièrement les études.

Dans ce projet, ces biais expérimentaux existent :

Dans la préparation de la STZ : la STZ se dégradant très rapidement en solution, elle doit être injectée très rapidement pour avoir une induction optimale. L'injection de STZ se réalisait sur une série de 5 souris, l'effet de l'injection entre la première et la dernière peut diminuer et impliquer que certaines souris ne devenaient pas diabétiques.

Dans le suivi des animaux : tout le long de ma thèse, le soin apporté aux animaux s'est amélioré. La durée de suivi des animaux a été augmentée dans la seconde moitié de la thèse permettant à ces animaux de vivre longtemps avec la maladie sans dégradation précoce avec un accès plus ouvert à la nourriture et à la boisson, logés dans de plus grandes cages les week-ends (polyurie abondante).

L'apport important des PEAlm sur la caractérisation physiopathologie surtout dans le modèle CBA/JrJ qui n'était pas prévu dans le projet de thèse a été pertinent dans la caractérisation d'une atteinte au niveau des voies nerveuses auditives centrales.

Au cours de ce projet, seule l'oreille droite a été explorée. Il aurait été pertinent d'explorer et de comparer les réponses au niveau des deux oreilles. Il existe sans doute un

impact de cette « surstimulation » en fragilisant l'oreille droite et biaiser les mesures suivantes avec un seuil plus élevé et une sensibilité plus précoce aux sons de haute fréquence.

En perspective de cette étude, il serait pertinent de regarder l'impact du diabète sur la fonction auditive dans un environnement avec un trauma sonore pour comparer avec ce qui a été réalisé dans la littérature scientifique. Également, il serait pertinent de réaliser une évaluation vestibulaire afin de voir si l'autre organe de l'oreille interne est aussi atteint.

En parallèle aux explorations auditives centrales, il serait intéressant d'analyser histologiquement ou immunohistologiquement les voies auditives centrales afin de savoir quels marqueurs neuronaux puissent être touchés et de visualiser quels mécanismes sous-tendent cette atteinte neurale auditive.

Fiches Matériel et Méthodes

Fiche n°1 : Animaux

- Cadre d'éthique

Dans le cadre de ce projet, les expérimentations réalisées sur animal ont été étudiées et validées par le comité d'éthique en expérimentation animale et le ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. L'ensemble des expérimentations animales a été mené sous les autorisations du comité d'éthique local avec les numéros APAFIS 34402 (concernant la souche C57Bl/6) et 34126 (souche CBA/J) et selon la Directive du Conseil de la Communauté européenne du 22 septembre 2010 (2010/63/UE) tout en respectant la « règle des trois R* ». En application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R.214-87 à R.214-126, les projets :

- référencé sous le numéro APAFIS #34402-2021121609155129 v3
- référencé sous le numéro APAFIS #34126-2021112312177927 v5

ont été autorisés.

- Origine

Les animaux utilisés dans ce projet sont de type murin de 3 souches différentes : C57Bl/6JrJ, C57Bl/6NrJ et CBA/JrJ. Les souris ont été fournies par le laboratoire Janvier Labs® (Le Genest-Saint-Isle, France). Toutes les souris étaient des souris mâles âgées de 5 semaines à leur arrivée au laboratoire.

Les animaux ont été stabulés en animalerie conventionnelle au sein de la Faculté de Médecine et des Professions Paramédicales de l'Université Clermont Auvergne. Les souris ont été hébergés par lot de 3 à 6 souris par cage de dimensions 20x40x15 cm, avec une température ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), une pression atmosphérique et une ambiance sonore ($< 40 \text{ dB SPL}$) contrôlées dans leur salle de stabulation. Leur salle de stabulation était exposée à un cycle lumière/obscurité 12h/12h (lumière de 7h à 19h). Dès leur arrivée, les animaux ont été laissés en stabulation durant une semaine pour l'habitué à l'environnement avant toute expérimentation. Les animaux étaient nourris avec une alimentation standard pour rongeurs et avaient un accès libre à la nourriture et à l'eau. Toutes les manipulations ont été réalisées durant les phases diurnes.

Le fait d'induire une pathologie provoquant des troubles métaboliques, les souris ont été surveillées quotidiennement avec un accès facilité à la nourriture et à la boisson. Les souris

ayant un syndrome métabolique hyperglycémique ont montré une polyurie associée. Pour cette raison, ces animaux ont reçu un change plus soutenu de litière (3 fois par semaine contre 1 change hebdomadaire pour les autres).

Notre projet étudie l'impact de l'induction d'une pathologie diabétique sur la fonction auditive. Les 3 souches ont été choisies pour leurs utilisations dans la littérature scientifique dans les 2 domaines ici étudiés : le diabète et l'audition.

La souris de souche C57Bl/6JrJ présente une dégradation de sa fonction auditive dès le 2ème mois de vie (modèle de surdité liée à l'âge ou presbyacousie) (Zheng et al., 1999).

La souris de souche C57Bl/6NrJ présente également une dégradation de sa fonction auditive liée à l'âge. Ces 2 souches C57Bl/6 sont porteurs de l'allèle de susceptibilité à la surdité *Cdh23^{ahl}* mais la souche C57Bl/6NrJ n'a pas été évaluée auparavant pour la perte auditive liée à l'âge contrairement à la souche C57Bl/6JrJ (Kane et al., 2012). La souche C57BL/6N a été utilisée dans notre projet car elle n'est pas porteuse de la mutation du gène *Nnt* contrairement à la C57BL/6J. Elle peut donc servir de témoin dans les études métaboliques mettant en jeu les mécanismes de tolérance au glucose, comme les régimes DIO (Diet Induced Obesity) ou les études induisant un diabète en comparaison à la C57BL/6J (Fontaine et Davis 2016 ; Toye et al., 2005).

La souris de souche CBA/JrJ est connue pour posséder une fonction auditive stable sur près de 2 ans (Ohlemiller et al., 2010). Elle est régulièrement utilisée dans les études liées à la fonction auditive (Ohlemiller et al., 2011 ; Vasilyeva et al., 2009 ; Spongr et al., 1997 ; McGinn et al., 1992).

Fiche n°2 : Préparation de la Streptozotocine (STZ)

La streptozotocine (STZ) est un composé chimique sous la forme d'une poudre blanche de formule $C_8H_{15}N_3O_7$ (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France).

La STZ, est obtenue à partir de *Streptomyces achromogenes*, décrite pour la première fois pour son action antibactérienne en 1959 (Vavra et al., 1959). La streptozotocine est un agent d'alkylation de l'ADN induisant une rupture chromosomique, qui pénètre dans les cellules exclusivement via la protéine de transport du glucose GLUT2. La STZ est particulièrement toxique pour les cellules β des îlots pancréatiques productrices d'insuline (Rakieten et al., 1963). Elle est toxique pour les cellules tumorales neuroendocrines positives à GLUT2. Dans la littérature scientifique, l'injection de STZ est actuellement la méthode la plus commune pour induire chimiquement et rapidement un syndrome métabolique diabétique de type 1 (Lenzen 2017).

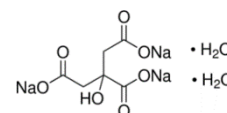
Cliniquement, ce produit chimique est utilisé pour le traitement du carcinome cellulaire du pancréas β . La STZ est principalement utilisé dans le traitement des tumeurs du pancréas (cellules des îlots) ainsi que pour le traitement d'insulinomes malins. La STZ ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique, mais ses métabolites se trouvent dans le liquide céphalo-rachidien. Sa demi-vie biologique dans le milieu de culture cellulaire est d'environ 15 à 20 minutes (Furman, 2021 ; Lenzen, 2008). Burcelin et al., sont les premiers à utiliser l'injection intraveineuse de streptozotocine chez des rats à une dose de 65 mg/kg de poids corporel pour induire un diabète en utilisant un tampon de citrate de sodium froid 0,1 M à pH 4,5 (Burcelin et al., 1992). Le tampon citrate augmente la durée de vie biologique de la STZ quand la STZ est mise en solution par rapport à un tampon de sérum physiologique. Sur les modèles murins, une unique haute dose de STZ à 200 mg/kg a montré une toxicité rapide sur les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Cette toxicité a été montrée par une augmentation du taux de glycémie dans les 48 heures suivant l'injection de STZ sur un modèle murin CD-1 (Like et Rossini, 1976).

Dans notre protocole (voir ci-dessous), la STZ pour être injectée, doit être diluée dans une solution tampon de citrate de sodium 0.1M à pH acide de 4.5 pour une meilleure solubilité. La solution sera préparée pour une injection à des doses de STZ allant de 125 à 200mg/kg.

Fiche Protocole – Préparation et Injection de la Streptozotocine (STZ)

Matériel :

- Streptozotocine / Streptozocin : poudre blanchâtre 500 mg
- Solution tampon : Sodium Citrate tribasic dihydrate : poudre blanche
 - o Masse moléculaire : 294.10 g/mol
- Eau distillée
- Acide chlorhydrique HCl 10N
- Balance de précision au millième de gramme
- pH-mètre
- Micropipette + cônes
- Coupelle de pesée
- Éprouvette graduée 50 mL
- Tube Eppendorf 2mL
- Bécher 150 mL
- Agitateur
- Papier aluminium



Préparation de la solution de Streptozotocine :

- Préparation de la solution tampon de Citrate de sodium 0.1M pH 4.5

Peser 1.47g de Sodium Citrate tribasic dihydrate à l'aide d'une coupelle de pesée.

Placer 30 mL d'eau distillée à l'aide d'une éprouvette graduée dans un bécher.

Ajouter le Sodium Citrate puis 10 mL d'eau distillée en rinçant les résidus sur la coupelle.

Mesurer le pH de la solution et ajuster le pH à 4.5 en ajoutant goutte à goutte de l'acide chlorhydrique 10N avec une micropipette.



Attention : Relever le volume mis de HCl pour ajuster le volume final à 50 mL.

Ajuster le volume à 50 mL en ajoutant de l'eau distillée.

Conserver la solution à 4°C au réfrigérateur jusqu'à utilisation (stable pendant 1 semaine).

Sous agitation

- Préparation de la solution de Streptozotocine

Pour une concentration de **200 mg/kg** de solution à injecter d'un volume de 0,1 mL/10 g de poids corporel :

Peser **40 mg** (0.03 g) de Streptozotocine à l'aide d'une balance de précision sous une hotte dans un tube Eppendorf (**30 mg et 25 mg pour respectivement une concentration de 150 et 125 mg/kg**).

Ajouter 2 mL de solution tampon de citrate de sodium à l'aide d'une micropipette.

Agiter énergiquement pour diluer la STZ dans la solution tampon.

Attention :



- **Après dissolution, la solution doit être injectée dans les 15 minutes. La Streptozotocine dans la solution tampon n'est stable que 15-20 minutes après la préparation de la solution.**

- **La Streptozotocine est sensible à la lumière, le tube doit être protégé de la lumière avec du papier aluminium.**

- Injection de la solution de Streptozotocine

Avant l'administration de la solution, les animaux devront être mis à jeun pendant 6h. La nourriture seule sera enlevée, l'accès à l'eau étant conservée.

Injecter la solution par la voie intrapéritonéale, le volume administré sera en fonction du poids de l'animal : **0.1mL pour 10g** du poids de l'animal.

Les animaux seront ensuite remis dans leurs cages d'habitation et la nourriture sera remise 1h après l'injection de la solution.



Attention : Les animaux devront être surveillés pendant 2h après administration de la solution acide de Streptozotocine provoquant un mal-être chez les animaux (immobilité).

Fiche n°3 : Phénotypage hyperglycémique

Après l'injection de STZ, différents paramètres physiologiques sont étudiés pour mesurer si la dose de STZ utilisée a induit ou non un syndrome diabétique. Dans la littérature scientifique étudiant le lien entre le diabète et la fonction auditive, les deux paramètres les plus utilisés pour mesurer l'induction d'un diabète sont les mesures du suivi du poids corporel et du taux de glycémie à jeun (concentration du sucre dans le sang) (Lyu et al., 2021 ; Fujita et al., 2012 ; Vasilyeva et al., 2009).

- Suivi du poids corporel

Le suivi du poids corporel a été réalisé à l'aide d'une balance de précision au dixième de gramme (Ohaus®, New Jersey, États-Unis). Ce suivi a été fait quotidiennement sur les 2 premiers jours suivant l'injection de STZ puis hebdomadairement sur 8 semaines pour l'étude 1 et sur 16 semaines pour l'étude 2.

- Mesure du taux de glycémie

Dès leur arrivée, 1 semaine en amont de l'induction du diabète, les souris ont été habituées à entrer dans un tube de contention. Ce tube a servi à maintenir les animaux durant la prise de la glycémie. L'habitué des souris au tube de contention a été réalisée 2 fois par jour durant 1 semaine. Ce geste consistait à laisser chaque souris pendant 1 minute dans un tube de contention permettant d'avoir accès à la queue de l'animal. Ce temps de contention a été calculé selon le temps nécessaire à réaliser les gestes de désinfection et de prélèvement sanguin. Durant cette habitude, les souris ont été marquées avec un code couleur à l'aide d'un feutre afin de les différencier, sachant que les souris recevant la STZ et les souris contrôles seront dans la même cage.

Avant l'injection de STZ, les souris ont été mises à jeun 6h avant la prise de leur taux de glycémie. Pour la mesure de la glycémie (en mg/dL), un prélèvement sanguin capillaire est réalisé à l'extrémité de la queue. Il est effectué par une légère piqûre à l'aide d'une aiguille de 26 G (Gauge) au niveau de la veine caudale (localisée sur la face dorsale de la queue). Une goutte de sang a été prélevée et déposée sur une électrode de dosage permettant de mesurer, à l'aide un lecteur de glycémie (FreeStyle Optium Neo H ®, Abbott, France), la valeur de glycémie à l'instant t de la souris. Le lecteur affiche des valeurs de 20 à 500 mg/dL. Pour les valeurs au-delà de 500 mg/dL, les résultats de dosage de la glycémie sont inclus à 500 mg/dL lors du calcul des moyennes. La queue des souris a été nettoyée avant et après prélèvement

sanguin avec de l'alcool à 70°. Comme pour le suivi du poids corporel, la mesure du taux de glycémie a été faite quotidiennement sur les 2 premiers jours suivant l'injection de STZ puis hebdomadairement sur 8 semaines pour l'étude 1 et sur 16 semaines pour l'étude 2.

- Suivi de l'état général

En parallèle à ces 2 mesures, le suivi de l'état général des animaux a été évalué. Ce suivi a été adapté du Body Condition Scoring (BCS) (Ullman-Culleré et Foltz, 1999). Le score de l'état général corporel des animaux est une évaluation rapide, non-invasive et efficace du bien-être physique d'un animal. Dans la littérature scientifique, le score de l'état général est considéré comme un meilleur critère de détermination des points limites des animaux que le poids corporel. Ce score de condition physique comprend plusieurs paramètres en plus du poids corporel tels que les aptitudes comportementales (exploration, isolement, activité locomotrice). L'aspect physique est également évalué dans ce score par la posture de l'animal (dos voûté), l'état du poil et des pattes des animaux, l'état d'hydratation (polyurie) ainsi que la douleur ressentie (par exemple, vocalisation de détresse, de défense). Tous ces paramètres sont notés pour donner un score général de l'état corporel allant de 1 à 5. Ce suivi reste cependant subjectif à l'expérimentateur.

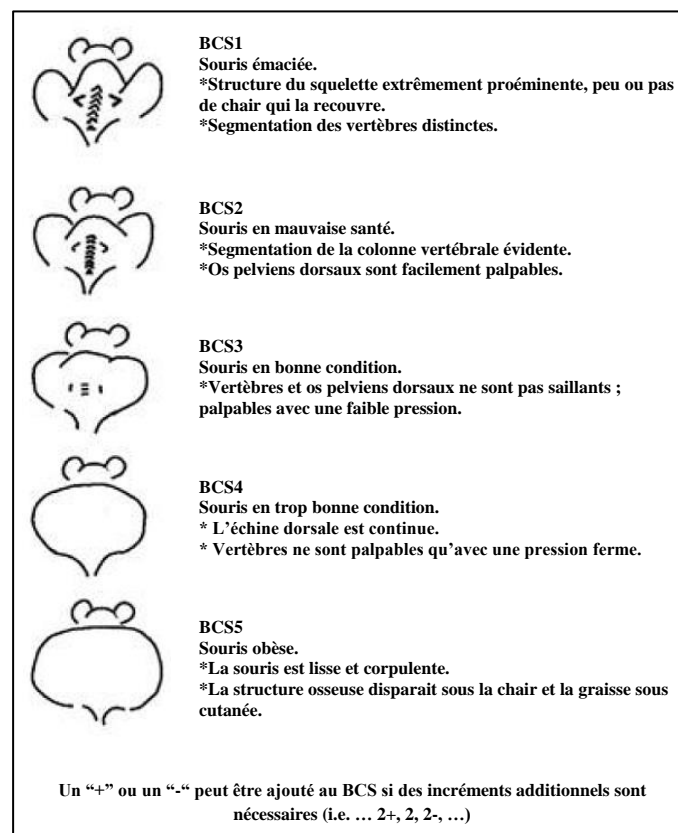


Figure 36 : Description du score de l'état corporel ou Body Condition Score (BCS) des animaux. Traduit d'après Ullman-Culleré et Foltz, 1999

- **Survie**

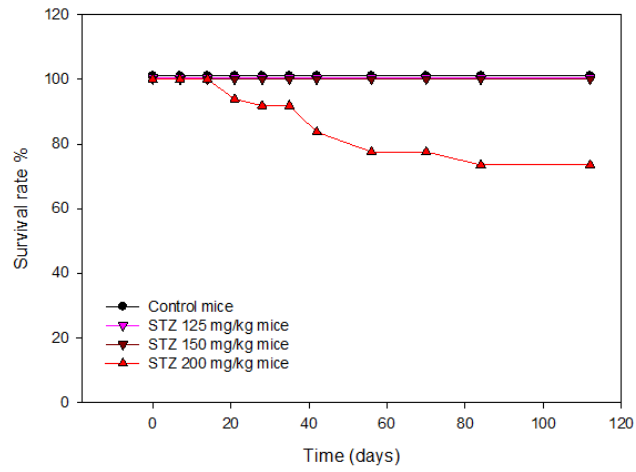
Les modèles murins de diabète de type 1, par l'injection d'une unique très haute dose de STZ (200 mg/kg), ont démontré une mortalité plus élevée (de 10 à 50% de taux de mortalité post-injection) que sur d'autres modèles avec des doses inférieures ou d'autres modèles diabétiques (Furman, 2021 ; Deeds et al., 2011 ; Ventura-Sobrevilla et al., 2011 ; Vasilyeva et al., 2009). Pour notre étude, la courbe de survie a été réalisé pour les 3 souches de souris utilisées : C57Bl/6JrJ, C57Bl/6NrJ, CBA/JrJ.

Suite à l'injection de STZ, la souche C57Bl/6NrJ a démontré une dégradation rapide de son état général. Trois semaines après l'induction du diabète par la STZ, la quasi-totalité des souris ayant reçu l'injection de STZ (11 sur 12 souris injectées) ont été sacrifiées pour diminuer la souffrance engendrée selon la règle des 3R.

Les souches C57Bl/6JrJ (environ 80% de survie après 16 semaines post-injection) et CBA/JrJ (environ 95% de survie) ont démontré une robustesse et une meilleure tolérance à l'injection de STZ dans le temps. Ces 2 souches vont représenter nos 2 modèles pour notre projet étudiant l'impact du diabète sur la fonction auditive.

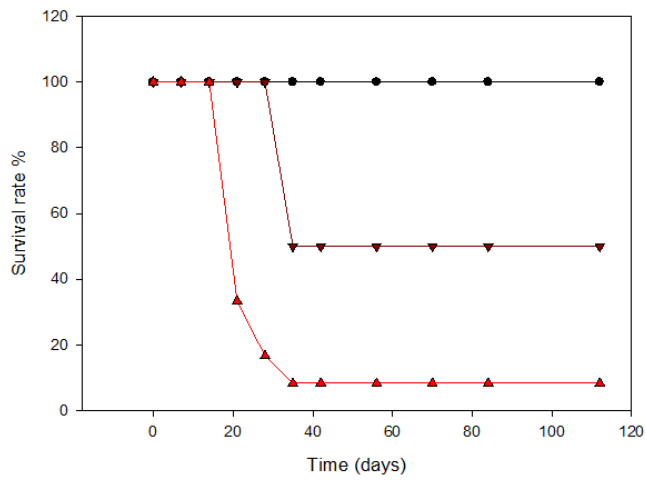
A

C57Bl/6JrJ



B

C57Bl/6NrJ



C

CBA/JrJ

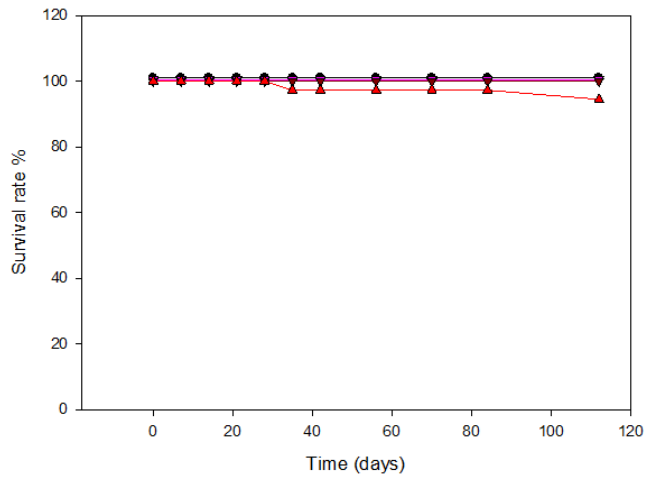


Figure 37 : Représentation du taux de survie sur la durée des expérimentations pour les souches C57Bl/6JrJ (A), C57Bl/6NrJ (B) et CBA/JrJ (C)

- **Vitesse de conduction neurale (VCN)**

Pour confirmer l'induction d'un syndrome métabolique diabétique, la mesure de la vitesse de conduction neurale (VCN) a été utilisée. Une des complications les plus communes du diabète est la neuropathie périphérique. La VCN est une méthode d'électrophysiologie qui est utilisée dans le diagnostic de neuropathies chez le patient et chez l'animal (Sullivan et al., 2007). La VCN permet, alors, de tester les nerfs périphériques afin de déterminer la morphologie des réponses électrophysiologiques puis le seuil, la latence et l'amplitude pour finalement obtenir la VCN. L'étude de la VCN consiste à étudier l'évocation d'une réponse neurale suite à une stimulation électrique et donc vérifier le bon fonctionnement des nerfs (conduction de l'influx nerveux) (Walsh et al., 2015).

Notre protocole reprend le protocole précédemment utilisé dans notre équipe de recherche (Petit et al., 2014). Cette technique est utilisée pour son caractère mini-invasif, n'induisant de douleur supplémentaire aux animaux. Tout au long de cette mesure de VCN, les animaux ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane. Pour la mesure de la VCN, l'isoflurane est la méthode d'anesthésie la plus efficace pour minimiser l'impact sur la VCN (Oh et al., 2010). L'anesthésie a été induite avec 4% d'isoflurane (Virbac, Vetflurane® 1000 mg/g) dans une chambre puis maintenue pendant la totalité de la manipulation à 1.5% à l'aide d'un masque. Les souris ont été placées en position ventrale de manière à laisser leur queue complètement libre, sur une couverture chauffante (Phymep® 53-8210) automatiquement régulée, permettant le maintien de leur température corporelle à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Leur température centrale a constamment été vérifiée à l'aide d'une sonde rectale (BioSeb® AZ8851). Avant la mesure, la queue des souris a été nettoyée avec de l'alcool à 70°.

Des mesures électrophysiologiques ont été enregistrées grâce à l'appareil Neuropack μ MEB-9100® (Nihon Kohden, Japon) en stimulant le nerf caudal de la queue de la souris. Une paire d'électrodes d'enregistrement a été placée à la base de la queue, tandis qu'une paire d'électrodes de stimulation a été insérée à 6 cm caudalement, selon le protocole réalisé (Petit et al., 2014). Une électrode terre a été placée entre les électrodes de stimulation et d'enregistrement. Les VCN sensorielles ont été enregistrées dans la direction orthodromique (durée : 0,1 ms ; intensité 0 à 1 mA par pas de 0,1 mA, filtre passe-haut : 2 Hz ; filtre passe-bas : 5 kHz).

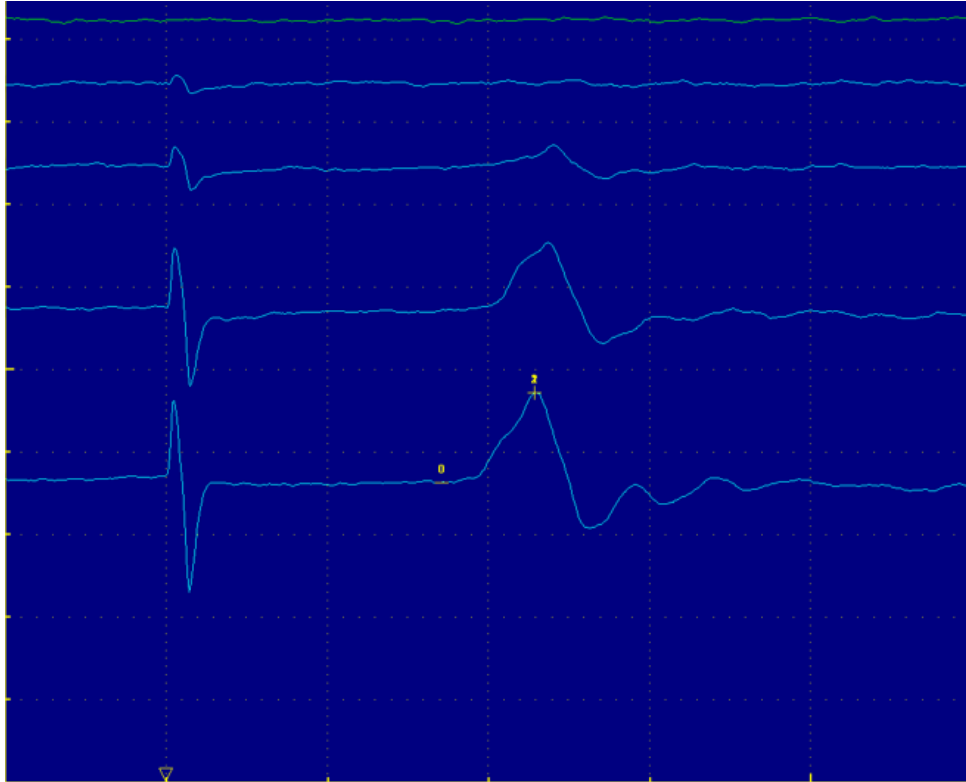


Figure 38 : Exemple d'un enregistrement de VCN chez une souris contrôle CBA/JrJ (logiciel d'enregistrement et d'analyse Examination Manager). En abscisse, une division représente 1 millisecondes. En ordonnée, chaque division représente 5 microvolts. De haut en bas : enregistrements à une stimulation électrique de 0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 et 1 mA. L'onde visible dès la stimulation (0 ms) représente un artefact de stimulation.

Les VCN caudales ont été calculées en mesurant la distance entre les électrodes d'enregistrement et de stimulation divisée par la latence entre l'artefact du stimulus et le pic du potentiel d'action déclenché. Deux enregistrements à une intensité de stimulation de 1 mA (moyenne de 10 réponses) ont été notés par souris. Les mesures ont été réalisées toutes les 3 semaines sur 9 semaines à partir de l'injection de STZ.

Fiche n°4 : Utilisation de l'anesthésie

Dans notre projet, la question du choix de l'anesthésie pour effectuer nos mesures électrophysiologiques a été posée. Nos enregistrements mesurant la fonctionnalité des nerfs (VCN) ou la fonction auditive (voir Fiches n°5, 6 et 7) ont nécessité d'utiliser des méthodes d'anesthésie différentes pour minimiser l'impact de l'anesthésique sur nos résultats. Nos études travaillant sur le diabète, la littérature scientifique a montré que l'utilisation d'anesthésiques (kétamine/xylazine et isoflurane) induisait un pic hyperglycémique durant l'anesthésie. Cela a impliqué de ne pas effectuer une prise de glycémie durant une anesthésie sous peine d'induire un biais expérimental et d'accroître la surveillance sur les souris diabétiques (Yu et al., 2020 ; Saha et al., 2005).

L'action de l'anesthésie produit également un effet sur la fonction auditive et plus particulièrement au niveau de la cochlée. Selon l'anesthésique et la technique d'exploration auditive utilisées, des biais de réponses peuvent exister. L'utilisation d'isoflurane induit un effet sur la mesure des potentiels évoqués auditifs précoces (PEAp) probablement en agissant sur le nerf cochléaire. Également, l'utilisation d'anesthésique à base de kétamine peut provoquer un biais de mesure sur les produits de distorsion des otoémissions acoustiques (PDA) (Cederholm et al., 2012).

Dans nos études, l'utilisation de l'isoflurane a été privilégié. En effet, la durée de nos expérimentations plutôt courte (maximum 45 minutes pour les explorations auditives) était plus en adéquation avec ce type d'anesthésie gazeuse. Le réveil et la récupération de l'activité locomotrice ont été plus rapides avec l'isoflurane. Il a été aussi observé durant les expérimentations que les souris diabétiques avaient une meilleure récupération après une anesthésie par isoflurane que par kétamine/xylazine. La xylazine étant un myorelaxant, a provoqué une anesthésie plus profonde que l'isoflurane impliquant une récupération beaucoup plus longue, néfaste pour les souris diabétiques. Cependant, pour l'enregistrement des potentiels évoqués auditifs de latence moyenne (PEAlm), l'utilisation de l'anesthésie par kétamine a permis d'obtenir un signal de réponse électrophysiologique propre et moins parasité par des mouvements respiratoires ou par un tonus musculaire par rapport à l'anesthésie par isoflurane.

Durant toutes les expérimentations sous anesthésie, les souris ont été placées en position ventrale sur une couverture chauffante (Phymep® 53-8210) automatiquement régulée, permettant le maintien de leur température corporelle à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Leur température centrale

a constamment été vérifiée à l'aide d'une sonde rectale (BioSeb® AZ8851). Pour éviter le dessèchement des yeux, un gel ophtalmique pour animaux (Ocry-gel, TVM France®) a été apposé sur les yeux des animaux.

Pour les mesures de VCN, de PDA et de PEAp, l'anesthésie a été induite par inhalation d'isoflurane à 4% (Vetflurane® 1000 mg/g, Virbac France) dans une chambre puis maintenue pendant la totalité de la manipulation à 1,5% à l'aide d'un masque.

Pour la mesure de PEAlm, l'anesthésie a été induite par l'injection d'un mélange de kétamine (100 mg/kg) / xylazine (10 mg/kg) dans du sérum physiologique.

Fiche n°5 : Exploration acoustique – Produits de distorsion des otoémissions acoustiques

Lorsqu'une stimulation acoustique calibrée est appliquée dans le conduit auditif externe, il est possible de recueillir en retour une réponse physiologique acoustique issue d'une population particulière de la cochlée : les cellules ciliées externes. Pour cela une sonde miniaturisée contenant deux haut-parleurs et un microphone sensible est délicatement introduite dans le conduit auditif externe de la souris. Cette technique de réalisation simple, rapide (5 minutes par animal) et non invasive renseigne sur la fonction cochléaire et sur la physiologie des cellules ciliées externes. Elle est très utilisée en clinique et a été transposée en préclinique.

Les produits de distorsions acoustiques (PDA) ont été mesurés grâce à une chaîne de stimulation et d'acquisition, pilotée par un ordinateur et une plateforme de génération et d'acquisition.

Un logiciel dédié (OtoPhylab, RT Conception, Echodia®, Clermont-Ferrand, France) a permis de générer une stimulation composée de deux sons de fréquences F1 et F2. Les deux sons stimulants (dits primaires), ayant pour fréquences respectives F1 et F2 vont engendrer l'émission d'un produit de distorsion caractéristique : $2F1-F2$. A titre d'exemple, en présentant deux sons $F1 = 10000$ Hz et $F2 = 12000$ Hz, le produit de distorsion attendu sera $2F1-F2 = 8000$ Hz. Le produit de distorsion généré est de fréquence plus basse et d'amplitude plus faible que les sons primaires F1 et F2. Les niveaux d'amplitude des sons F1 et F2, respectivement L1 et L2, sont identiques.

Les PDA ont été mesurés en réponse à des sons d'intensités de 20 à 70 dB SPL par pas de 5 dB. Ils ont été examinés pour des fréquences F2 de 8, 10, 16, 24 et 32 kHz.



Figure 39 : Exemple du dispositif expérimental d'un enregistrement de produits de distorsion des otoémissions acoustiques (Echodia, France).

Oreille : Droite - 16000 Hz

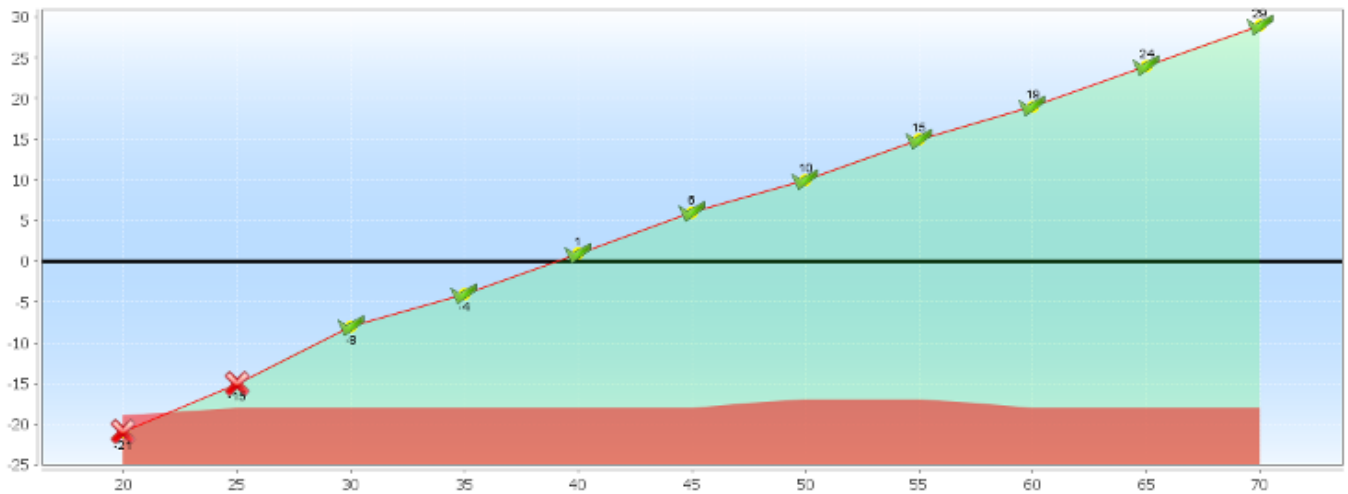


Figure 40 : Exemple d'un enregistrement de PDA à 16 kHz chez une souris contrôlée C57Bl/6JrJ (OtoPhylab, Echodia, France).

C'est l'amplitude du PDA qui sera retenue comme critère d'évaluation de la fonction cochléaire et plus précisément des CCE de la région émettrice (celle à la fréquence de 8000 Hz dans l'exemple utilisé ci-dessus). Le seuil des PDA a été défini comme le niveau sonore le plus bas produisant un PDA d'une amplitude d'au moins 7 dB au-dessus du bruit de fond. Sur l'exemple ci-dessus (Figure 35), le seuil retenu est de 30 dB. Les mesures ont été réalisées toutes les 4 semaines sur 16 semaines à partir de l'injection de STZ.

Le seuil des PDA ainsi que l'amplitude ont été mesurés et analysés dans le cadre de l'étude n°2 du projet portant sur l'étude de l'impact d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la fonction auditive périphérique sur des modèles murins.

Fiche n°6 : Exploration électrophysiologique auditive – Potentiels évoqués auditifs précoces

Afin d'évaluer l'impact du diabète sur la fonction auditive, des mesures électrophysiologiques auditive ont été réalisées. Ces mesures sont focalisées sur la mesure de potentiels évoqués auditifs précoces (PEAp). Tout comme les PDA, les PEA_p sont beaucoup utilisées dans les études précliniques explorant la fonction auditive. C'est une technique d'électrophysiologie non invasive basée sur le principe de l'électro-encéphalographie (EEG). Les PEA_p fournissent des renseignements objectifs, reproductibles sur la fonction auditive depuis la cochlée jusqu'au tronc cérébral.

Comme les PDA, les PEA_p ont été mesurés grâce à une chaîne de stimulation et d'acquisition, pilotée par un ordinateur et une plateforme de génération et d'acquisition (OtoPhylab, RT Conception, Echodia®, Clermont-Ferrand, France). Les PEA_p permettent d'objectiver la conduction neurale dans les voies auditives et également de déterminer le seuil auditif pour chaque oreille. Les PEA_p peuvent informer sur la présence ou non de pathologies cochléaires (surdité de perception avec élévation des seuils auditifs), de dysfonctionnements possibles dans ces voies auditives : neurinome de l'acoustique, maladies démyélinisantes (sclérose en plaques, leucodystrophie...), ou toutes maladies rétro-cochléaires et la neuropathie auditive.

Les PEA_p sont évoqués à l'aide d'un écouteur envoyant des sons calibrés à différentes fréquences et à différentes intensités de stimulation. Les PEA_p sont enregistrés à l'aide d'électrodes intradermiques (aiguille EEG, Comepa Industries®) placées au niveau de la masto ide ( lectrode active), du vertex (sommet du crâne, électrode passive) et au niveau du dos (entre les omoplates ou dans le bas du dos, terre). La réponse provenant des électrodes a été amplifiée et filtrée (300-4000 Hz).



Figure 41 : Exemple du dispositif expérimental d'un enregistrement de potentiels évoqués auditifs précoces (Echodia, France)

Un tracé typique de PEA_p présente 5 ondes numérotées de I à V. C'est la présence ou non de ces ondes et leurs placements temporels qui vont permettre de dépister différentes pathologies. Il est admis que l'onde I est générée par la portion distale du nerf auditif, l'onde II par la portion proximale, l'onde III par le noyau cochléaire et l'onde V par le colliculus inférieur controlatéral à la stimulation (Tanaka et al., 2023 ; Henry, 1979). Sur un tracé de PEA_p, les ondes visibles sont les ondes I, III et V. Les ondes II et IV sont considérées comme aléatoires et sont souvent inclus dans les ondes I et III.

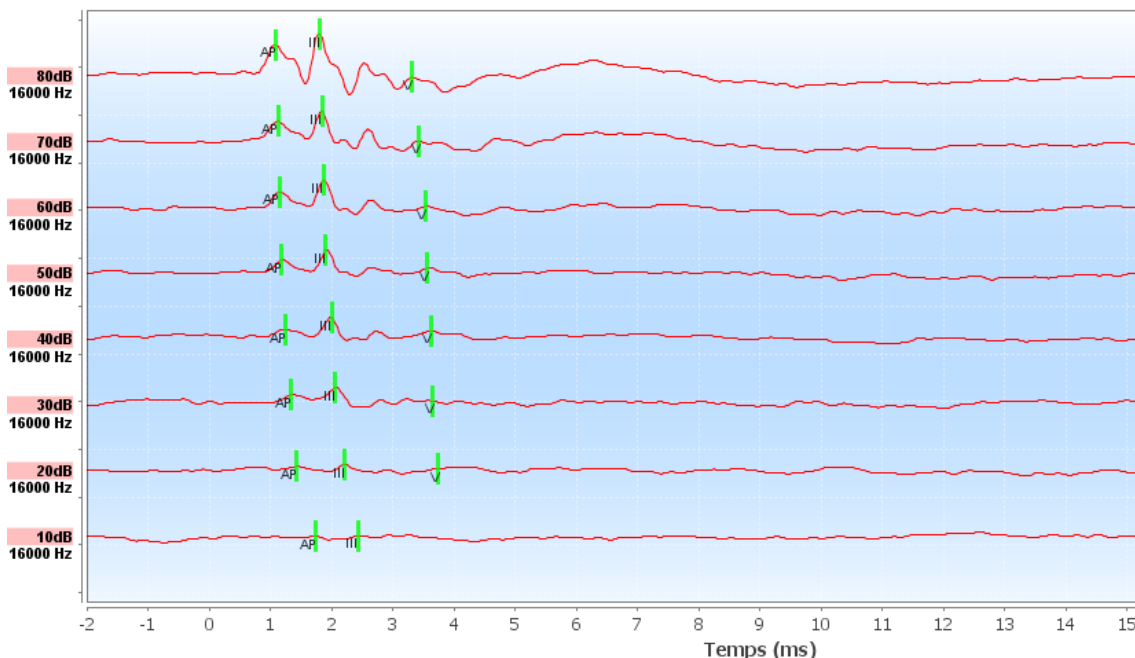


Figure 42 : Exemple d'un enregistrement de PEA_p à une fréquence de stimulation de 16 kHz et d'intensité décroissante de 80 à 10 dB SPL à chez une souris contrôle CBA/JrJ (OtoPhylab, Echodia, France)

Dans ce projet, le protocole d'enregistrement des PEA_p est le suivant : les PEA_p ont été obtenus en réponse à une bouffée tonale (10 sinus de montée, 10 sinus de plateau, 10 sinus de

descente, polarité alternée, cadence = 33 stim/s, 300 présentations). Le stimulus acoustique sera généré par un générateur de signaux arbitraires inclus dans l'appareil OtoPhylab produisant des impulsions sonores à différentes fréquences (8, 10, 16, 24 et 32 kHz) avec une intensité de stimulation décroissante de 10 dB à 100 dB SPL par incréments de 10 dB. L'intensité à laquelle une forme d'onde PEAp est toujours détectée visuellement au-dessus du bruit de fond, est définie comme le seuil PEAp. Sur l'exemple ci-dessus (*Figure 37*), le seuil PEAp retenu est de 10 dB. Par souci de cohérence, seules les ondes I, III, V ont été marquées, mesurées et analysées. Les mesures ont été réalisées toutes les 4 semaines sur 16 semaines à partir de l'injection de STZ.

Le seuil PEAp, les latences des ondes I, III et V, les intervalles inter pics I-III et I-V ainsi que l'amplitude de l'onde I ont été mesurés et analysés dans le cadre de l'étude n°2 du projet portant sur l'étude de l'impact d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la fonction auditive périphérique sur des modèles murins. Pour chaque fréquence analysée, la moyenne a été obtenue sur 2 enregistrements successifs afin d'obtenir une reproductibilité des mesures.

Fiche n°7 : Exploration électrophysiologique auditive – Potentiels évoqués auditifs de latence moyenne

Les potentiels évoqués auditifs de latence moyenne (PEAlm) ont été recueillis de la même façon que les PEAp à l'aide d'électrodes aiguilles (aiguille EEG, Comepa Industries®) placées sous la peau de la souris : l'électrode passive au niveau du vertex, l'électrode active au niveau de la mastoïde et la terre (ou masse) au niveau du dos (entre les omoplates ou dans le bas du dos). La réponse provenant des électrodes a été amplifiée, filtrée (20-2000 Hz), convertie numériquement et moyennée (300 balayages) par un enregistreur à deux canaux (Neuropack μ ® - MEB 9104, Nihon Kohden). Les ondes ont été visualisées avec le logiciel Examination Manager.

Les PEAlm ont été obtenus en réponse à une bouffée tonale raréfiée (1 ms de montée, 1 ms de plateau, 1 ms de descente, avec un filtre de Blackman-Harris, durée = 0,1 ms, cadence = 7 Hz, polarité raréfiée, 300 présentations).

Le stimulus acoustique a été généré par un générateur de forme arbitraire (TG4001-Thurlby Thandar Instruments) aux fréquences de 10, 16, 24 et 32 kHz. L'intensité du stimulus acoustique a été atténuée pour obtenir une stimulation sonore de 80 dB SPL grâce à un atténuateur (PA4/SM3/HB6/XB1- Tucker Davies Technologies) puis il a été envoyé à un haut-parleur haute fréquence (FT17H - Fostex) placé dans le conduit auditif externe de la souris.

Similairement aux PEAp, l'enregistrement des PEAlm est une technique d'électrophysiologie non invasive basée sur le principe de l'électro-encéphalographie (EEG). La technique de PEAlm est plutôt utilisée pour explorer la conduction nerveuse dans les voies auditives centrales. Un tracé de PEAlm présente 4 ondes : P₀, N₀, P_a, N_a dont 2 visibles avec notre matériel P_a et N_a. Ces ondes sont représentatives de la région thalamique des voies auditives. Cette technique renseigne sur de possibles dysfonctionnements du système nerveux central telles que par exemple des neuropathies auditives.

Les mesures ont été réalisées à trois reprises à 8, 12 et 16 semaines à partir de l'injection de STZ.

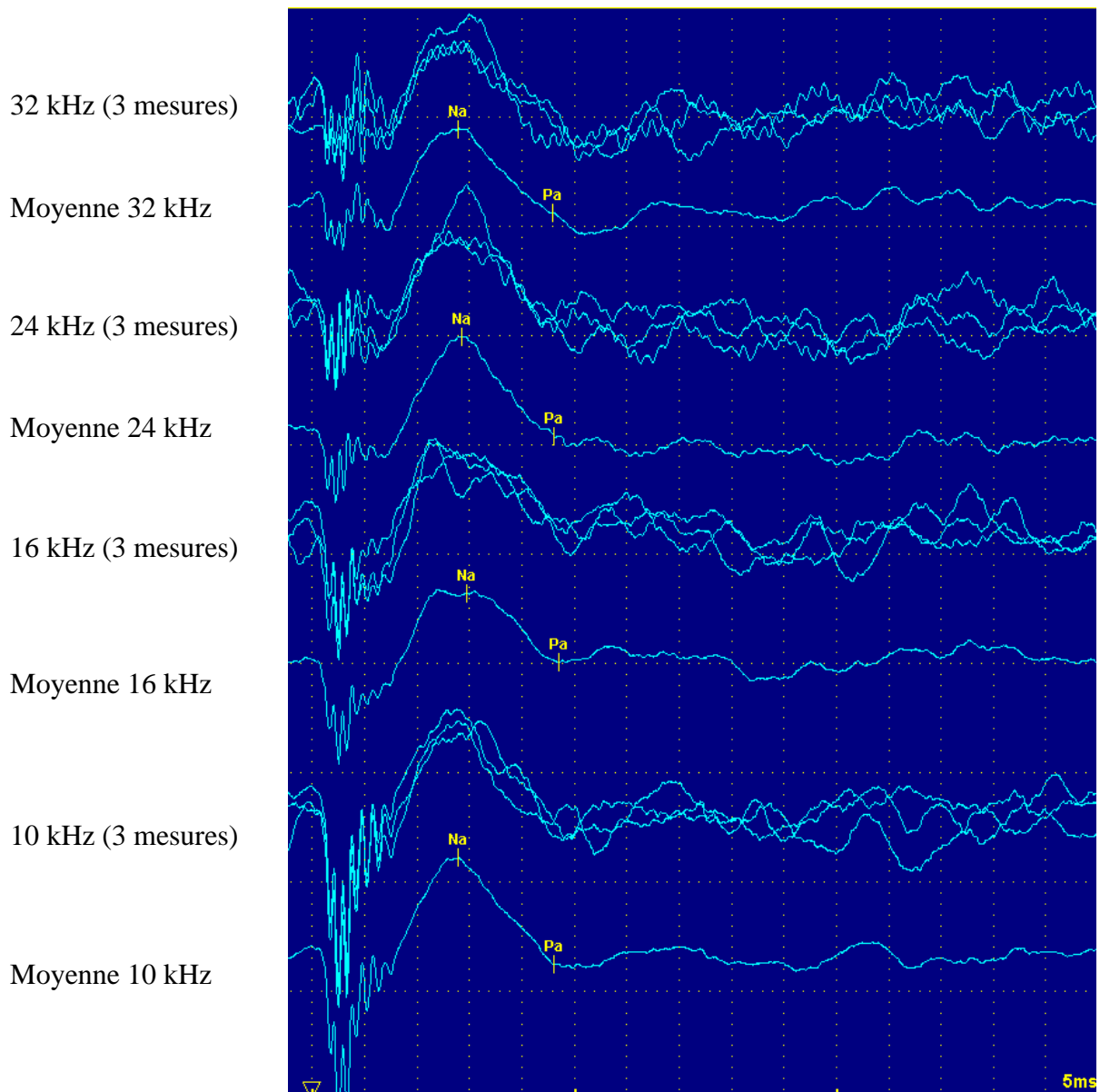


Figure 43 : Exemple d'un enregistrement de PEALm à une intensité de 80 dB SPL chez une souris contrôle C57Bl/6JrJ (logiciel d'enregistrement et d'analyse Examination Manager). En abscisse, une division représente 5 millisecondes.

En ordonnée, chaque division représente 5 microvolts. De haut en bas : enregistrements et leurs moyennes respectives à 32, 24, 16 et 10 kHz. Les ondes visibles durant les 5 premières millisecondes d'enregistrement représentent les PEAp.

Les latences des ondes N_a et P_a , l'amplitude ainsi que l'intervalle de temps entre N_a et P_a ont été mesurés et analysés pour l'étude n°3 portant sur l'étude de l'impact d'un syndrome métabolique hyperglycémique sur la fonction auditive périphérique sur des modèles murins. Pour chaque fréquence analysée, la moyenne a été obtenue sur 3 enregistrements successifs afin d'obtenir une reproductibilité des mesures.

Fiche n°8 : Analyse histologique

A la fin des expérimentations, les os temporaux ont été prélevés après sacrifice des souris par dislocation cervicale après une pré-anesthésie par inhalation d'isoflurane. Les os ont ensuite été disséqués sous loupe binoculaire dans du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline, Sigma-Aldrich) afin de récupérer les cochlées. Les cochlées ont été placées dans du PFA à 4 % (Paraformaldéhyde, Sigma-Aldrich) une nuit à 4 °C. Le jour suivant, les échantillons ont été rincés 3 fois pendant 10 minutes avec du PBS à 0,1 M puis placés dans une solution d'EDTA (Acide éthylène diamine tétraacétique, Sigma-Aldrich) à 0,5 M pendant 7 jours. La solution d'EDTA a été renouvelée tous les jours pendant cette période.

Les échantillons ont été rincés 3 fois au PBS pendant 10 minutes puis ils ont été mis dans de l'alcool à 70 °C. Ils ont été placés dans un automate pour la nuit et ont été déshydratés dans différents bains d'alcool (de 70 ° à 100 °) puis dans un bain de solvant Ottix plus (Diapath). Les cochlées ont ensuite été incluses en paraffine puis les blocs obtenus ont été coupés au microtome par tranche de 5 µm. Les coupes ont été déparaffinées puis colorées selon le protocole de coloration hématoxyline/érythrosine (*protocole ci-dessous*). Enfin, elles ont été montées entre lame et lamelle avec de la colle Eukitt (Sigma-Aldrich).

Les lames ont été visualisées avec un microscope optique (Revelation III LED, LW Scientific) et les photos ont été prises à l'aide d'une caméra et du logiciel dédié ISCapture. Pour le comptage des cellules du ganglion spiral, un masque correspondant à un rectangle de 10000 µm² a été superposé aux images dans la zone d'intérêt, et toutes les cellules visibles dans cette zone ont été dénombrées à l'aide du logiciel associé ISCapture. Un total de 4 à 5 images de coupes a été analysé par cochlée prélevée (n=6 pour chaque groupe) pour chaque zone du ganglion spiral (tour apical, tour intermédiaire et tour basal).

Protocole pour la coloration HE (Hématoxyline, Erythrosine)

Liste des produits :

Xylène

Alcool 100 %, 95 %, 70%

Hématoxyline de Harris (sigma ref HHS32-1L)

Erythrosine extra bluish (sigma ref E8886-25) 4g/L

Eukitt® quick-hardening mounting medium (Sigma)

Procédure :

- Placer les lames à colorer dans l'étuve à 56°C durant 30 minutes
 - Préparer les coppling jahr
 - Sortir les lames de l'étuve et commencer les étapes de déparaffinage/réhydratation/coloration
-
1. Xylène 5 min
 2. Xylène 5 min
 3. Alcool 100 % 5 min
 4. Alcool 95 % 5 min
 5. Alcool 70 % 5 min
 6. Rinçage à l'eau courante (placer chariot dans un récipient et faire couler de l'eau du robinet par débordement) 2-5 min
 7. Hématoxyline de Harris 30 s
 8. Rincer à l'eau 2-5 min
 9. Erythrosine extra bluish 4g/L30 s
 10. Rincer à l'eau 2-5 min
 11. Alcool 100% 30 s
 12. Alcool 100% 30 s
 13. Alcool 100% 30 s
 14. Xylène 30 s
 15. Xylène 30 s
-
- Coller la lamelle sur la lame à l'aide de la colle et laisser sécher (colle Eukitt)

Fiche n°9 : Analyse statistique

Sur les graphiques, les valeurs moyennes sont exprimées \pm l'erreur standard à la moyenne (\pm SEM). Les astérisques indiquent des différences significatives : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et n = nombre de souris dans chaque groupe. Lorsque les conditions d'application d'un test paramétrique étaient respectées (distribution normale des échantillons), la comparaison de deux groupes a été effectuée à l'aide d'un test de Shapiro-Wilk. Sinon, un test non paramétrique a été utilisé, le test Wilcoxon-Mann-Whitney. Les comparaisons des données ont été effectuées entre chaque groupe de souris traitées avec la streptozotocine et le groupe de souris contrôle par le test statistique t de Student. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, CA).

Conclusion générale

Il est admis que le lien entre diabète et audition est en cours d'étude. De plus en plus de recherche permettant d'établir ou non cette association voient le jour. De nombreuses revues relatant toutes les études cliniques et précliniques sur ce sujet sont d'actualité (Deng et al., 2023 ; Gioacchini et al., 2023). Il a été révélé que les personnes diabétiques étaient plus susceptibles à être atteints d'une perte auditive. Il a tout d'abord été montré que cette atteinte auditive probablement liée à une hyperglycémie était d'origine vasculaire avec un épaissement de la strie vasculaire accompagné d'une atrophie des vaisseaux sanguins cochléaires. Puis des études plus récentes ont montré que les patients diabétiques possédaient un retard de latence des ondes auditives dévoilant une implication rétrocochléaire, possiblement une neuropathie auditive.

Dans le même temps, des études précliniques se sont intéressés à travailler si ce lien entre diabète et audition pouvait exister autres que dans des pathologies rares (syndrome de Wolfram, ataxie de Friedreich). Certaines études ont montré que les modèles animaux diabétiques pouvaient être plus susceptibles à un trouble auditif après un trauma sonore. Les études qui ont suivi se sont intéressés à comprendre et à caractériser les mécanismes sous-tendant de cette atteinte auditive causés par le diabète. Certains auteurs ont montré que le lien entre diabète et audition était d'origine vasculaire comme montré en clinique mais aussi neural avec la dégénérescence des neurones du ganglion spiral. Ces atteintes sont aussi liées à un dysfonctionnement mitochondrial. L'altération des mitochondries pourrait être à l'origine des conséquences vasculaires et neurales. Ces troubles sont causés par une hyperglycémie. La voie de signalisation de l'insuline est altérée et a pour conséquence la production de radicaux libres et d'espèces réactives à l'oxygène qui induit à la fin une mort cellulaire via apoptose.

Ces études qui ont montré sont originaires d'Asie. En Europe, aucune étude n'a montré ce lien ou les hypothèses sur les différentes causes. Ce sujet reste encore très discuté.

Suite à une étude clinique de l'équipe du laboratoire sur cette susceptibilité auditive chez des patients diabétiques de type 2, l'idée de caractériser les mécanismes provoquant une perte auditive chez des modèles animaux diabétiques est alors possible.

Après avoir modélisé un diabète de type 1 sur des souris mâles jeunes qui ont ou non une susceptibilité à une perte de l'audition précoce, il a été montré que le lien entre diabète et

perte auditive existait. Les souris les plus fragiles auditivement parlant, ont montré une atteinte du système auditif périphérique avec des seuils auditifs et des latences des ondes PEAp plus élevés par rapport aux souris contrôles. Cette atteinte peut être d'origine vasculaire (montré indirectement par le dysfonctionnement des CCE (mesures des PDA) mais également neurale avec une diminution du nombre des neurones du ganglion spiral.

Mais le plus intéressant dans ce travail de thèse, ce sont les résultats obtenus sur la souche murine ayant une audition stable sur 2 ans. Après avoir induit un diabète (hyperglycémie sévère, neuropathie périphérique), ce modèle diabétique n'a montré aucune atteinte du système auditif périphérique (seuils, latences et amplitudes normaux). Cependant, après l'analyse histologique, une tendance à une perte des neurones du ganglion spiral était visible. Pour cela, une exploration des voies auditives centrales a été faite par la mesure des PEA de latence moyenne correspondant aux ondes de la région thalamique. Cette mesure a montré un retard de latence des onde PEAlm pouvant conclure à une possible atteinte auditive d'origine neurale ou surdité « silencieuse ».

Il serait intéressant de continuer pour comprendre si cette mesure préliminaire est reproductible et si oui quelles en seraient les causes exactes.

Bibliographie

- Akinpelu, O. V., Mujica-Mota, M., & Daniel, S. J. (2014). Is type 2 diabetes mellitus associated with alterations in hearing? A systematic review and meta-analysis. *The Laryngoscope*, *124*(3), 767-776. <https://doi.org/10.1002/lary.24354>
- Al-awar, A., Kupai, K., Veszeka, M., Szűcs, G., Attieh, Z., Murlasits, Z., Török, S., Pósa, A., & Varga, C. (2016). Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *Journal of Diabetes Research*, *2016*, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2016/9051426>
- AlJasser, A., Uus, K., Prendergast, G., & Plack, C. J. (2020). Subclinical Auditory Neural Deficits in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus. *Ear & Hearing*, *41*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1097/AUD.0000000000000781>
- Alpers, C. E., & Hudkins, K. L. (2011). Mouse models of diabetic nephropathy: *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, *20*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3283451901>
- Alstrom, C. H., Hallgren, B., Nilsson, L. B., & Asander, H. (1959). Retinal degeneration combined with obesity, diabetes mellitus and neurogenous deafness : A specific syndrome (not hitherto described) distinct from the Laurence-Moon-Bardet-Biedl syndrome: a clinical, endocrinological and genetic examination based on a large pedigree. *Acta Psychiatrica Et Neurologica Scandinavica. Supplementum*, *129*, 1-35.
- Aubin, A.-M., Lombard-Vadnais, F., Collin, R., Aliesky, H. A., McLachlan, S. M., & Lesage, S. (2022). The NOD Mouse Beyond Autoimmune Diabetes. *Frontiers in Immunology*, *13*, 874769. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.874769>
- Bagai, A. (2006). Does This Patient Have Hearing Impairment? *JAMA*, *295*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1001/jama.295.4.416>

- Bahiru, E., Hsiao, R., Phillipson, D., & Watson, K. E. (2021). Mechanisms and Treatment of Dyslipidemia in Diabetes. *Current Cardiology Reports*, 23(4), Article 4. <https://doi.org/10.1007/s11886-021-01455-w>
- Baiduc, R. R., & Helzner, E. P. (2019). Epidemiology of Diabetes and Hearing Loss. *Seminars in Hearing*, 40(04), Article 04. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1697643>
- Barrett, T. G., & Bunday, S. E. (1997). Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 34(10), Article 10. <https://doi.org/10.1136/jmg.34.10.838>
- Beiswenger, K. K., Calcutt, N. A., & Mizisin, A. P. (2008). Dissociation of thermal hypoalgesia and epidermal denervation in streptozotocin-diabetic mice. *Neuroscience Letters*, 442(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.06.079>
- Beqiri-Jashari, A., Janchevska, A., Ahmeti, I., Doksimovski, F., Cipanovska, M., Teov, B., Stefanovska, E. S., Plaseska-Karanfilska, D., & Gucev, Z. (2022). Alström Syndrome with Early Vision and Hearing Impairment. *PRILOZI*, 43(2), Article 2. <https://doi.org/10.2478/prilozi-2022-0028>
- Bluestone, J. A., Buckner, J. H., Fitch, M., Gitelman, S. E., Gupta, S., Hellerstein, M. K., Herold, K. C., Lares, A., Lee, M. R., Li, K., Liu, W., Long, S. A., Masiello, L. M., Nguyen, V., Putnam, A. L., Rieck, M., Sayre, P. H., & Tang, Q. (2015). Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Science Translational Medicine*, 7(315), Article 315. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad4134>
- Bluestone, J. A., Herold, K., & Eisenbarth, G. (2010). Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*, 464(7293), Article 7293. <https://doi.org/10.1038/nature08933>
- Boucher, S., & Avan, P. (2023). Physiologie cochléaire : anatomie, connaissances cellulaires et moléculaires au service de la compréhension des explorations électrophysiologiques. *EMC – Oto-rhino-laryngologie*, 38(2), Article 2. [https://doi.org/10.1016/S0246-0351\(22\)42887-X](https://doi.org/10.1016/S0246-0351(22)42887-X)

- Burcelin, R., Eddouks, M., Kande, J., Assan, R., & Girard, J. (1992). Evidence that GLUT-2 mRNA and protein concentrations are decreased by hyperinsulinaemia and increased by hyperglycaemia in liver of diabetic rats. *Biochemical Journal*, 288(2), Article 2. <https://doi.org/10.1042/bj2880675>
- Calcutt, N. A., Jorge, M. C., Yaksh, T. L., & Chaplan, S. R. (1996). Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats : Effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. *Pain*, 68(2), Article 2. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(96\)03201-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(96)03201-0)
- Callaghan, B. C., Price, R. S., Chen, K. S., & Feldman, E. L. (2015). The Importance of Rare Subtypes in Diagnosis and Treatment of Peripheral Neuropathy : A Review. *JAMA Neurology*, 72(12), Article 12. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.2347>
- Carricondo, F., & Romero-Gómez, B. (2019). The Cochlear Spiral Ganglion Neurons : The Auditory Portion of the VIII Nerve. *The Anatomical Record*, 302(3), Article 3. <https://doi.org/10.1002/ar.23815>
- Castañeda-Corral, G., Velázquez-Salazar, N. B., Martínez-Martínez, A., Taboada-Serrano, J. N., Núñez-Aragón, P. N., González-Palomares, L., Acosta-González, R. I., Petricevich, V. L., Acevedo-Fernández, J. J., Montes, S., & Jiménez-Andrade, J. M. (2021). Characterization of Mechanical Allodynia and Skin Innervation in a Mouse Model of Type-2 Diabetes Induced by Cafeteria-Style Diet and Low-Doses of Streptozotocin. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 628438. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.628438>
- Cederholm, J. M. E., Froud, K. E., Wong, A. C. Y., Ko, M., Ryan, A. F., & Housley, G. D. (2012). Differential actions of isoflurane and ketamine-based anaesthetics on cochlear function in the mouse. *Hearing Research*, S0378595512002031. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.08.010>
- Chatterjee, S., Khunti, K., & Davies, M. J. (2017). Type 2 diabetes. *The Lancet*, 389(10085), Article 10085. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30058-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30058-2)

- Chen, H., Birnbaum, Y., Ye, R., Yang, H.-C., Bajaj, M., & Ye, Y. (2022). SGLT2 Inhibition by Dapagliflozin Attenuates Diabetic Ketoacidosis in Mice with Type-1 Diabetes. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 36(6), Article 6. <https://doi.org/10.1007/s10557-021-07243-6>
- Cnop, M., Igoillo-Esteve, M., Rai, M., Begu, A., Serroukh, Y., Depondt, C., Musuaya, A. E., Marhfour, I., Ladrière, L., Moles Lopez, X., Lefkaditis, D., Moore, F., Brion, J., Cooper, J. M., Schapira, A. H. V., Clark, A., Koeppen, A. H., Marchetti, P., Pandolfo, M., ... Féry, F. (2012). Central role and mechanisms of β -cell dysfunction and death in friedreich ataxia-associated diabetes. *Annals of Neurology*, 72(6), Article 6. <https://doi.org/10.1002/ana.23698>
- Cnop, M., Mulder, H., & Igoillo-Esteve, M. (2013). Diabetes in Friedreich Ataxia. *Journal of Neurochemistry*, 126(s1), Article s1. <https://doi.org/10.1111/jnc.12216>
- De La Monte, S. M., & Wands, J. R. (2008). Alzheimer's Disease is Type 3 Diabetes—Evidence Reviewed. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 2(6), Article 6. <https://doi.org/10.1177/193229680800200619>
- Deeds, M. C., Anderson, J. M., Armstrong, A. S., Gastineau, D. A., Hiddinga, H. J., Jahangir, A., Eberhardt, N. L., & Kudva, Y. C. (2011). Single dose streptozotocin-induced diabetes : Considerations for study design in islet transplantation models. *Laboratory Animals*, 45(3), Article 3. <https://doi.org/10.1258/la.2010.010090>
- Dekel, Y., Glucksam, Y., Elron-Gross, I., & Margalit, R. (2009). Insights into modeling streptozotocin-induced diabetes in ICR mice. *Lab Animal*, 38(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/labam0209-55>
- Deng, Y., Chen, S., & Hu, J. (2023). Diabetes mellitus and hearing loss. *Molecular Medicine*, 29(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s10020-023-00737-z>
- DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 391(10138), Article 10138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5)

- Doostkam, A., Mirkhani, H., Irvani, K., Karbalay-Doust, S., & Zarei, K. (2021). Effect of Rutin on Diabetic Auditory Neuropathy in an Experimental Rat Model. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology*, 14(3), Article 3. <https://doi.org/10.21053/ceo.2019.02068>
- Driver, J. P., Serreze, D. V., & Chen, Y.-G. (2011). Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes : A NOD to similarities and differences to human disease. *Seminars in Immunopathology*, 33(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s00281-010-0204-1>
- D'Silva, L. J., Lin, J., Staecker, H., Whitney, S. L., & Kluding, P. M. (2016). Impact of Diabetic Complications on Balance and Falls : Contribution of the Vestibular System. *Physical Therapy*, 96(3), Article 3. <https://doi.org/10.2522/ptj.20140604>
- Edamatsu, M., Kondo, Y., & Ando, M. (2011). Multiple expression of glucose transporters in the lateral wall of the cochlear duct studied by quantitative real-time PCR assay. *Neuroscience Letters*, 490(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.12.029>
- Elangovan, S., & Spankovich, C. (2019). Diabetes and Auditory-Vestibular Pathology. *Seminars in Hearing*, 40(04), Article 04. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1697033>
- Feldman, E. L., Callaghan, B. C., Pop-Busui, R., Zochodne, D. W., Wright, D. E., Bennett, D. L., Bril, V., Russell, J. W., & Viswanathan, V. (2019). Diabetic neuropathy. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0092-1>
- Feldman, E. L., Nave, K.-A., Jensen, T. S., & Bennett, D. L. H. (2017). New Horizons in Diabetic Neuropathy : Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. *Neuron*, 93(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.005>
- Fernandes, L. D. C., Andrade, C. L. O. D., Adan, L. F. F., & Ladeia, A. M. T. (2023). Study of auditory pathways in type 1 diabetes mellitus through brainstem auditory evoked potentials and contralateral acoustic reflex. *CoDAS*, 35(2), Article 2. <https://doi.org/10.1590/2317-1782/20232021022>

- Fontaine, D. A., & Davis, D. B. (2016). Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research : C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium. *Diabetes*, 65(1), Article 1. <https://doi.org/10.2337/db15-0982>
- Forbes, J. M., & Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiological Reviews*, 93(1), Article 1. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011>
- Forbes, J. M., & Fotheringham, A. K. (2017). Vascular complications in diabetes : Old messages, new thoughts. *Diabetologia*, 60(11), Article 11. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4360-x>
- Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., & Viollet, B. (2014). Metformin : From Mechanisms of Action to Therapies. *Cell Metabolism*, 20(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.018>
- Frank, R. N. (2004). Diabetic Retinopathy. *New England Journal of Medicine*, 350(1), Article 1. <https://doi.org/10.1056/NEJMra021678>
- Fujita, T., Yamashita, D., Katsunuma, S., Hasegawa, S., Tanimoto, H., & Nibu, K. (2012). Increased Inner Ear Susceptibility to Noise Injury in Mice With Streptozotocin-Induced Diabetes. *Diabetes*, 61(11), Article 11. <https://doi.org/10.2337/db11-1845>
- Fukushima, H., Cureoglu, S., Schachern, P. A., Kusunoki, T., Oktay, M. F., Fukushima, N., Paparella, M. M., & Harada, T. (2005). Cochlear Changes in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 133(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.otohns.2005.02.004>
- Fukushima, H., Cureoglu, S., Schachern, P. A., Paparella, M. M., Harada, T., & Oktay, M. F. (2006). Effects of Type 2 Diabetes Mellitus on Cochlear Structure in Humans. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 132(9), Article 9. <https://doi.org/10.1001/archotol.132.9.934>
- Furman, B. L. (2015). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology*, 70(1), Article 1. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70>

- Gates, G. A., & Mills, J. H. (2005). Presbycusis. *The Lancet*, 366(9491), Article 9491.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67423-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67423-5)
- Gillespie, K. M. (2006). Type 1 diabetes : Pathogenesis and prevention. *Canadian Medical Association Journal*, 175(2), Article 2. <https://doi.org/10.1503/cmaj.060244>
- Gioacchini, F. M., Pisani, D., Viola, P., Astorina, A., Scarpa, A., Libonati, F. A., Tulli, M., Re, M., & Chiarella, G. (2023). Diabetes Mellitus and Hearing Loss : A Complex Relationship. *Medicina*, 59(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/medicina59020269>
- Giocanti-Auregan, A., Tadayoni, R., Ahn, L., Pena, J. T., & D'Amico, D. J. (2013). Revue systématique de la littérature des modèles murins de rétinopathie diabétique. *Journal Français d'Ophtalmologie*, 36(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2012.08.001>
- Giraudet, F., & Avan, P. (2012). Auditory neuropathies : Understanding their pathogenesis to illuminate intervention strategies. *Current Opinion in Neurology*, 25(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32834f0351>
- Giraudet, F., Charles, P., Mom, T., Boespflug-Tanguy, O., Dürr, A., Deltenre, P., & Avan, P. (2018). Rapid exhaustion of auditory neural conduction in a prototypical mitochondrial disease, Friedreich ataxia. *Clinical Neurophysiology*, 129(6), Article 6.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2018.03.005>
- Giraudet, F., Labanca, L., Souchal, M., & Avan, P. (2021). Decreased Reemerging Auditory Brainstem Responses Under Ipsilateral Broadband Masking as a Marker of Noise-Induced Cochlear Synaptopathy. *Ear & Hearing*, 42(4), Article 4.
<https://doi.org/10.1097/AUD.0000000000001009>
- Giraudet, F., Mulliez, A., De Resende, L. M., Beaud, L., Benichou, T., Brusseau, V., Tauveron, I., & Avan, P. (2022). Impaired auditory neural performance, another dimension of hearing loss in type-2 diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolism*, 48(6), Article 6.
<https://doi.org/10.1016/j.diabet.2022.101360>

- Graham, M. L., & Schuurman, H.-J. (2015). Validity of animal models of type 1 diabetes, and strategies to enhance their utility in translational research. *European Journal of Pharmacology*, 759, 221-230. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.02.054>
- Grarup, N., Sandholt, C. H., Hansen, T., & Pedersen, O. (2014). Genetic susceptibility to type 2 diabetes and obesity : From genome-wide association studies to rare variants and beyond. *Diabetologia*, 57(8), Article 8. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3270-4>
- Guinan, J. J. (2018). Olivocochlear efferents : Their action, effects, measurement and uses, and the impact of the new conception of cochlear mechanical responses. *Hearing Research*, 362, 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2017.12.012>
- Han, W. K., Kim, E. H., Shin, S.-A., Shin, D.-S., Kim, B. J., Lyu, A.-R., & Park, Y.-H. (2018). Susceptibility of Diabetic Mice to Noise Trauma. *BioMed Research International*, 2018, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2018/7601232>
- Hardikar, A., Karandikar, M., & Bhonde, R. (1999). Effect of partial pancreatectomy on diabetic status in BALB/c mice. *Journal of Endocrinology*, 162(2), Article 2. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1620189>
- Helzner, E. P., & Contrera, K. J. (2016). Type 2 Diabetes and Hearing Impairment. *Current Diabetes Reports*, 16(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s11892-015-0696-0>
- Henry, K. R. (1979). Auditory brainstem volume-conducted responses : Origins in the laboratory mouse. *Journal of the American Auditory Society*, 4(5), Article 5.
- Heydemann, A. (2016). An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2016/2902351>
- Hong, B. N., & Kang, T. H. (2008). Auditory neuropathy in streptozotocin-induced diabetic mouse. *Neuroscience Letters*, 431(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.11.053>

- Hong, B. N., & Kang, T. H. (2014). Distinction between auditory electrophysiological responses in type 1 and type 2 diabetic animal models. *Neuroscience Letters*, *566*, 309-314. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.02.060>
- Huerzeler, N., Petkovic, V., Sekulic-Jablanovic, M., Kucharava, K., Wright, M. B., & Bodmer, D. (2019). Insulin Receptor and Glucose Transporters in the Mammalian Cochlea. *Audiology and Neurotology*, *24*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1159/000499561>
- IDF.IDF diabetes atlas 2021. International Diabetes Federation; 2021
- Jagomäe, T., Gaur, N., Seppa, K., Reimets, R., Pastak, M., Plaas, M., Kaasik, A., Vasar, E., & Plaas, M. (2023). Treatment with the dual-incretin agonist DA-CH5 demonstrates potent therapeutic effect in a rat model of Wolfram Syndrome. *Frontiers in Endocrinology*, *14*, 1234925. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1234925>
- Jagomäe, T., Seppa, K., Reimets, R., Pastak, M., Plaas, M., Hickey, M. A., Kukker, K. G., Moons, L., De Groef, L., Vasar, E., Kaasik, A., Terasmaa, A., & Plaas, M. (2021). Early Intervention and Lifelong Treatment with GLP1 Receptor Agonist Liraglutide in a Wolfram Syndrome Rat Model with an Emphasis on Visual Neurodegeneration, Sensorineural Hearing Loss and Diabetic Phenotype. *Cells*, *10*(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/cells10113193>
- Jia, G., Whaley-Connell, A., & Sowers, J. R. (2018). Diabetic cardiomyopathy : A hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease. *Diabetologia*, *61*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4390-4>
- Johns, E. C., Denison, F. C., Norman, J. E., & Reynolds, R. M. (2018). Gestational Diabetes Mellitus : Mechanisms, Treatment, and Complications. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *29*(11), Article 11. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.09.004>
- Jolival, C. G., Frizzi, K. E., Guernsey, L., Marquez, A., Ochoa, J., Rodriguez, M., & Calcutt, N. A. (2016). Peripheral Neuropathy in Mouse Models of Diabetes. *Current Protocols in Mouse Biology*, *6*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1002/cpmo.11>

- Kane, K. L., Longo-Guess, C. M., Gagnon, L. H., Ding, D., Salvi, R. J., & Johnson, K. R. (2012). Genetic background effects on age-related hearing loss associated with *Cdh23* variants in mice. *Hearing Research*, 283(1-2), Article 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.11.007>
- Kanikarla-Marie, P., & Jain, S. K. (2016). Hyperketonemia and ketosis increase the risk of complications in type 1 diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 95, 268-277. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.020>
- Karzon, R., Narayanan, A., Chen, L., Lieu, J. E. C., & Hershey, T. (2018). Longitudinal hearing loss in Wolfram syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0852-0>
- Kim, M.-B., Zhang, Y., Chang, Y., Ryu, S., Choi, Y., Kwon, M.-J., Moon, I. J., Deal, J. A., Lin, F. R., Guallar, E., Chung, E. C., Hong, S. H., Ban, J. H., Shin, H., & Cho, J. (2017). Diabetes mellitus and the incidence of hearing loss: A cohort study. *International Journal of Epidemiology*, 46(2), Article 2. <https://doi.org/10.1093/ije/dyw243>
- King, A., & Bowe, J. (2016). Animal models for diabetes : Understanding the pathogenesis and finding new treatments. *Biochemical Pharmacology*, 99, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.108>
- King, A. J. (2012). The use of animal models in diabetes research : Animal models of diabetes. *British Journal of Pharmacology*, 166(3), Article 3. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x>
- Kolb, H. (1987). Mouse models of insulin dependent diabetes : Low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes/Metabolism Reviews*, 3(3), Article 3. <https://doi.org/10.1002/dmr.5610030308>
- Kolb, H., & Martin, S. (2017). Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Medicine*, 15(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0901-x>

- Kottaisamy, C. P. D., Raj, D. S., Prasanth Kumar, V., & Sankaran, U. (2021). Experimental animal models for diabetes and its related complications—A review. *Laboratory Animal Research*, 37(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s42826-021-00101-4>
- Kujawa, S. G., & Liberman, M. C. (2015). Synaptopathy in the noise-exposed and aging cochlea : Primary neural degeneration in acquired sensorineural hearing loss. *Hearing Research*, 330, 191-199. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2015.02.009>
- Le May, C., Chu, K., Hu, M., Ortega, C. S., Simpson, E. R., Korach, K. S., Tsai, M.-J., & Mauvais-Jarvis, F. (2006). Estrogens protect pancreatic β -cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), Article 24. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602956103>
- Lee, J.-H., Ji, S. H., Jung, J. Y., Lee, M. Y., & Lee, C.-K. (2021). High Blood Glucose Levels Affect Auditory Brainstem Responses after Acoustic Overexposure in Rats. *Audiology and Neurotology*, 26(4), Article 4. <https://doi.org/10.1159/000511448>
- Lee, Y. Y., Kim, Y. J., Gil, E. S., Kim, H., Jang, J. H., & Choung, Y.-H. (2020). Type 1 Diabetes Induces Hearing Loss : Functional and Histological Findings in An Akita Mouse Model. *Biomedicines*, 8(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8090343>
- Lee-Kubli, C. A., Mixcoatl-Zecuatl, T., Jolival, C. G., & Calcutt, N. A. (2014). Animal Models of Diabetes-Induced Neuropathic Pain. In B. K. Taylor & D. P. Finn (Éds.), *Behavioral Neurobiology of Chronic Pain* (Vol. 20, p. 147-170). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/7854_2014_280
- Leiter, E. H. (1982). Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice : Influence of inbred background, sex, and thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(2), Article 2. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.2.630>

- Lende, M., & Rijhsinghani, A. (2020). Gestational Diabetes : Overview with Emphasis on Medical Management. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(24), Article 24. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249573>
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), Article 2. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>
- Lenzen, S. (2017). Animal models of human type 1 diabetes for evaluating combination therapies and successful translation to the patient with type 1 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 33(7), Article 7. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2915>
- Li, F., Drel, V. R., Szabó, C., Stevens, M. J., & Obrosova, I. G. (2005). Low-Dose Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor-Containing Combination Therapies Reverse Early Peripheral Diabetic Neuropathy. *Diabetes*, 54(5), Article 5. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.5.1514>
- Like, A. A., & Rossini, A. A. (1976). Streptozotocin-Induced Pancreatic Insulinitis : New Model of Diabetes Mellitus. *Science*, 193(4251), Article 4251. <https://doi.org/10.1126/science.180605>
- Lynch, D. R., Schadt, K., Kichula, E., McCormack, S., & Lin, K. Y. (2021). Friedreich Ataxia : Multidisciplinary Clinical Care. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, Volume 14, 1645-1658. <https://doi.org/10.2147/JMDH.S292945>
- Lyu, A.-R., Kim, T.-H., Shin, S.-A., Kim, E.-H., Yu, Y., Gajbhiye, A., Kwon, H.-C., Je, A. R., Huh, Y. H., Park, M. J., & Park, Y.-H. (2021). Hearing Impairment in a Mouse Model of Diabetes Is Associated with Mitochondrial Dysfunction, Synaptopathy, and Activation of the Intrinsic Apoptosis Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/ijms22168807>
- Mansford, K. R. L., & Opie, L. (1968). COMPARISON OF METABOLIC ABNORMALITIES IN DIABETES MELLITUS INDUCED BY STREPTOZOTOCIN OR BY ALLOXAN. *The Lancet*, 291(7544), Article 7544. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(68\)92103-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(68)92103-X)

- Mathews, C. E., Langley, S. H., & Leiter, E. H. (2002). New mouse model to study islet transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus: *Transplantation*, 73(8), Article 8. <https://doi.org/10.1097/00007890-200204270-00024>
- McGinn, M. D., Bean-Knudsen, D., & Ermel, R. W. (1992). Incidence of otitis media in CBA/J and CBA/CaJ mice. *Hearing Research*, 59(1), Article 1. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(92\)90094-4](https://doi.org/10.1016/0378-5955(92)90094-4)
- McGonigle, P., & Ruggeri, B. (2014). Animal models of human disease : Challenges in enabling translation. *Biochemical Pharmacology*, 87(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.08.006>
- McMurray, F., & Cox, R. D. (2011). Mouse models and type 2 diabetes : Translational opportunities. *Mammalian Genome*, 22(7-8), Article 7-8. <https://doi.org/10.1007/s00335-011-9345-3>
- McQueen, C. T., Baxter, A., Smith, T. L., Raynor, E., Yoon, S. M., Prazma, J., & Pillsbury, H. C. (1999). Non-insulin-dependent diabetic microangiopathy in the inner ear. *The Journal of Laryngology & Otology*, 113(1), Article 1. <https://doi.org/10.1017/S0022215100143051>
- Moser, T., & Starr, A. (2016). Auditory neuropathy—Neural and synaptic mechanisms. *Nature Reviews Neurology*, 12(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.10>
- Mujica-Mota, M. A., Patel, N., & Saliba, I. (2018). Hearing loss in type 1 diabetes : Are we facing another microvascular disease? A meta-analysis. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 113, 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2018.07.005>
- Mullen, Y. (2017). Development of the Nonobese Diabetic Mouse and Contribution of Animal Models for Understanding Type 1 Diabetes. *Pancreas*, 46(4), Article 4. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000828>
- Murakami, T., Iwanaga, T., Ogawa, Y., Fujita, Y., Sato, E., Yoshitomi, H., Sunada, Y., & Nakamura, A. (2013). Development of sensory neuropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Brain and Behavior*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.1002/brb3.111>

- O'Brien, P. D., Hinder, L. M., Rumora, A. E., Hayes, J. M., Dauch, J. R., Backus, C., Mendelson, F. E., & Feldman, E. L. (2018). Juvenile murine models of prediabetes and type 2 diabetes develop neuropathy. *Disease Models & Mechanisms*, dmm.037374. <https://doi.org/10.1242/dmm.037374>
- O'Brien, P. D., Sakowski, S. A., & Feldman, E. L. (2014). Mouse Models of Diabetic Neuropathy. *ILAR Journal*, 54(3), Article 3. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilt052>
- Obrosova, I. (2011). Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition counteracts renal hypertrophy and multiple manifestations of peripheral neuropathy in diabetic Akita mice. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.709>
- Obrosova, I. G., Mabley, J. G., Zsengeller, Z., Charniauskaia, T., Abatan, O. I., Groves, J. T., & Szabó, C. (2005). Role for nitrosative stress in diabetic neuropathy : Evidence from studies with a peroxynitrite decomposition catalyst. *The FASEB Journal*, 19(3), Article 3. <https://doi.org/10.1096/fj.04-1913fje>
- Oh, S. S., Hayes, J. M., Sims-Robinson, C., Sullivan, K. A., & Feldman, E. L. (2010). The effects of anesthesia on measures of nerve conduction velocity in male C57Bl6/J mice. *Neuroscience Letters*, 483(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.07.076>
- Ohlemiller, K. K., Dahl, A. R., & Gagnon, P. M. (2010). Divergent Aging Characteristics in CBA/J and CBA/CaJ Mouse Cochleae. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 11(4), Article 4. <https://doi.org/10.1007/s10162-010-0228-1>
- Ohlemiller, K. K., Rybak Rice, M. E., Rellinger, E. A., & Ortmann, A. J. (2011). Divergence of noise vulnerability in cochleae of young CBA/J and CBA/CaJ mice. *Hearing Research*, 272(1-2), Article 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2010.11.006>
- Pålbrink, A.-K., Kopietz, F., Morén, B., In 'T Zandt, R., Kalinec, F., Stenkula, K., Göransson, O., Holm, C., Magnusson, M., & Degerman, E. (2020). Inner ear is a target for insulin signaling

- and insulin resistance : Evidence from mice and auditory HEI-OC1 cells. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2019-000820>
- Pandey, S., & Dvorakova, M. C. (2020). Future Perspective of Diabetic Animal Models. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 20(1), Article 1. <https://doi.org/10.2174/1871530319666190626143832>
- Papadopoulou-Marketou, N., Chrousos, G. P., & Kanaka-Gantenbein, C. (2017). Diabetic nephropathy in type 1 diabetes : A review of early natural history, pathogenesis, and diagnosis: Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 33(2), Article 2. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2841>
- Park, S. Y., Gautier, J.-F., & Chon, S. (2021). Assessment of Insulin Secretion and Insulin Resistance in Human. *Diabetes & Metabolism Journal*, 45(5), Article 5. <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0220>
- Petit, B., Giraudet, F., Béchon, C., Bardin, L., Avan, P., Boespflug-Tanguy, O., & Bégou, M. (2014). Mice with a deletion of the major central myelin protein exhibit hypersensitivity to noxious thermal stimuli : Involvement of central sensitization. *Neurobiology of Disease*, 65, 55-68. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.01.005>
- Radenković, M., Stojanović, M., & Prostran, M. (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin : The current state of the art. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 78, 13-31. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.11.004>
- Rakieten, N., Rakieten, M. L., & Nadkarni, M. R. (1963). Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemotherapy Reports*, 29, 91-98.

- Rance, G., Carew, P., Winata, L., Sale, P., Delatycki, M., & Sly, D. (2023). Auditory neuropathy in mice and humans with Friedreich ataxia. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.1002/acn3.51777>
- Rance, G., Corben, L., & Delatycki, M. (2012). Auditory Processing Deficits in Children With Friedreich Ataxia. *Journal of Child Neurology*, 27(9), Article 9. <https://doi.org/10.1177/0883073812448963>
- Rance, G., & Starr, A. (2015). Pathophysiological mechanisms and functional hearing consequences of auditory neuropathy. *Brain*, 138(11), Article 11. <https://doi.org/10.1093/brain/awv270>
- Ren, X., Lv, J., Fu, Y., Zhang, N., Zhang, C., Dong, Z., Chudhary, M., Zhong, S., Kong, L., & Kong, H. (2021). Upregulation of thioredoxin contributes to inhibiting diabetic hearing impairment. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 179, 109025. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109025>
- Richard, E. M., Brun, E., Korchagina, J., Crouzier, L., Affortit, C., Alves, S., Cazevieille, C., Mausset-Bonnefont, A.-L., Lenoir, M., Puel, J.-L., Maurice, T., Thiry, M., Wang, J., & Delprat, B. (2023). Wfs1E864K knock-in mice illuminate the fundamental role of Wfs1 in endocochlear potential production. *Cell Death & Disease*, 14(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05912-y>
- Rigoli, L., Caruso, V., Salzano, G., & Lombardo, F. (2022). Wolfram Syndrome 1 : From Genetics to Therapy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijerph19063225>
- Rondón, L. J., Privat, A. M., Daulhac, L., Davin, N., Mazur, A., Fialip, J., Eschalier, A., & Courteix, C. (2010). Magnesium attenuates chronic hypersensitivity and spinal cord NMDA receptor phosphorylation in a rat model of diabetic neuropathic pain : Magnesium supplementation improves diabetic neuropathic pain. *The Journal of Physiology*, 588(21), Article 21. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.197004>

- Rosanio, F. M., Di Candia, F., Occhiati, L., Fedi, L., Malvone, F. P., Foschini, D. F., Franzese, A., & Mozzillo, E. (2022). Wolfram Syndrome Type 2 : A Systematic Review of a Not Easily Identifiable Clinical Spectrum. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijerph19020835>
- Roux, I., Safieddine, S., Nouvian, R., Grati, M., Simmler, M.-C., Bahloul, A., Perfettini, I., Le Gall, M., Rostaing, P., Hamard, G., Triller, A., Avan, P., Moser, T., & Petit, C. (2006). Otoferlin, Defective in a Human Deafness Form, Is Essential for Exocytosis at the Auditory Ribbon Synapse. *Cell*, 127(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.040>
- Ruel, J., Emery, S., Nouvian, R., Bersot, T., Amilhon, B., Van Rybroek, J. M., Rebillard, G., Lenoir, M., Eybalin, M., Delprat, B., Sivakumaran, T. A., Giros, B., El Mestikawy, S., Moser, T., Smith, R. J. H., Lesperance, M. M., & Puel, J.-L. (2008). Impairment of SLC17A8 Encoding Vesicular Glutamate Transporter-3, VGLUT3, Underlies Nonsyndromic Deafness DFNA25 and Inner Hair Cell Dysfunction in Null Mice. *The American Journal of Human Genetics*, 83(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.07.008>
- Saha, J. K., Xia, J., Grondin, J. M., Engle, S. K., & Jakubowski, J. A. (2005). Acute Hyperglycemia Induced by Ketamine/Xylazine Anesthesia in Rats : Mechanisms and Implications for Preclinical Models. *Experimental Biology and Medicine*, 230(10), Article 10. <https://doi.org/10.1177/153537020523001012>
- Samocha-Bonet, D., Wu, B., & Ryugo, D. K. (2021). Diabetes mellitus and hearing loss : A review. *Ageing Research Reviews*, 71, 101423. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101423>
- Saroul, N., Giraudet, F., Gilain, L., Mom, T., & Avan, P. (2015). Physiologie cochléaire : bases anatomiques, cellulaires et électrophysiologiques. *EMC – Oto-rhino-laryngologie*, 10(4), Article 4. [https://doi.org/10.1016/S0246-0351\(15\)46983-1](https://doi.org/10.1016/S0246-0351(15)46983-1)
- Sassa, M., Yamada, Y., Hosokawa, M., Fukuda, K., Fujimoto, S., Toyoda, K., Tsukiyama, K., Seino, Y., & Inagaki, N. (2008). Glycemic instability in type 1 diabetic patients : Possible role of

- ketosis or ketoacidosis at onset of diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 81(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2008.04.009>
- Seo, H. W., Chung, J. H., Byun, H., Jeong, J., & Lee, S. H. (2020). Effect of Diabetes on the Prognosis of Sudden Sensorineural Hearing Loss: Propensity Score Matching Analysis. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 162(3), Article 3. <https://doi.org/10.1177/0194599820901359>
- Seo, Y. J., Shim, D. B., Sharif, A., Samson, Z., Takechi, R., & Brown, D. (2022). Circulatory disturbance of the cochlear spiral modiolar artery in a type 2 diabetic mouse model. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology*, 7(5), Article 5. <https://doi.org/10.1002/lio2.917>
- Shi, X. (2011). Physiopathology of the cochlear microcirculation. *Hearing Research*, 282(1-2), Article 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.08.006>
- Shi, X. (2016). Pathophysiology of the cochlear intrastrial fluid-blood barrier (review). *Hearing Research*, 338, 52-63. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.01.010>
- Smith, T. L., Raynor, E., Prazma, J., Buenting, J. E., & Pillsbury, H. C. (1995). Insulin-dependent diabetic microangiopathy in the inner ear. *The Laryngoscope*, 105(3), Article 3. <https://doi.org/10.1288/00005537-199503000-00002>
- Souchal, M., Labanca, L., Alves da Silva Carvalho, S., Macedo de Resende, L., Blavignac, C., Avan, P., & Giraudet, F. (2018). Transient Abnormalities in Masking Tuning Curve in Early Progressive Hearing Loss Mouse Model. *BioMed Research International*, 2018, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2018/6280969>
- Spankovich, C., Le Prell, C. G., Lobarinas, E., & Hood, L. J. (2017). Noise History and Auditory Function in Young Adults With and Without Type 1 Diabetes Mellitus. *Ear & Hearing*, 38(6), Article 6. <https://doi.org/10.1097/AUD.0000000000000457>

- Spankovich, C., & Yerraguntla, K. (2019). Evaluation and Management of Patients with Diabetes and Hearing Loss. *Seminars in Hearing*, 40(04), 308-314. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1697644>
- Spongr, V. P., Flood, D. G., Frisina, R. D., & Salvi, R. J. (1997). Quantitative measures of hair cell loss in CBA and C57BL/6 mice throughout their life spans. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 101(6), Article 6. <https://doi.org/10.1121/1.418315>
- Starr, A., Picton, T. W., Sininger, Y., Hood, L. J., & Berlin, C. I. (1996). Auditory neuropathy. *Brain*, 119(3), Article 3. <https://doi.org/10.1093/brain/119.3.741>
- Sullivan, K. A., Hayes, J. M., Wiggin, T. D., Backus, C., Su Oh, S., Lentz, S. I., Brosius, F., & Feldman, E. L. (2007). Mouse models of diabetic neuropathy. *Neurobiology of Disease*, 28(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.07.022>
- Tan, S.Y., Mei Wong, J. L., Sim, Y.J., Wong, S.S., Mohamed Elh., Tan, S.H., Ling Lim, G.P., Rong Tay, N.W., Annan, N.C., Bhattamisra, S.K., Candasamy, M. (2019). Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.10.008>
- Tanaka, K., Ohara, S., Matsuzaka, T., Matsugaki, A., Ishimoto, T., Ozasa, R., Kuroda, Y., Matsuo, K., & Nakano, T. (2023). Quantitative Threshold Determination of Auditory Brainstem Responses in Mouse Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/ijms241411393>
- Teng, Z.-P., Tian, R., Xing, F.-L., Tang, H., Xu, J.-J., Zhang, B.-W., & Qi, J.-W. (2017). An association of type 1 diabetes mellitus with auditory dysfunction : A systematic review and meta-analysis: Type 1 DM and Sensorineural Hearing Loss. *The Laryngoscope*, 127(7), Article 7. <https://doi.org/10.1002/lary.26346>

- Thulasiram, M. R., Ogier, J. M., & Dabdoub, A. (2022). Hearing Function, Degeneration, and Disease : Spotlight on the Stria Vascularis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*, 841708. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.841708>
- Toye, A. A., Lippiat, J. D., Proks, P., Shimomura, K., Bentley, L., Hugill, A., Mijat, V., Goldsworthy, M., Moir, L., Haynes, A., Quarterman, J., Freeman, H. C., Ashcroft, F. M., & Cox, R. D. (2005). A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia*, *48*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1680-z>
- Truy, E., Ionescu, E., Lina-Granade, G., Butnaru, C., Thai-Van, H., Furminieux, V., & Collet, L. (2005). Neuropathie auditive : Clinique et revue de la littérature. *Annales d'Otolaryngologie et de Chirurgie Cervico-faciale*, *122*(6), Article 6. [https://doi.org/10.1016/S0003-438X\(05\)82365-5](https://doi.org/10.1016/S0003-438X(05)82365-5)
- Tsuda, J., Sugahara, K., Hori, T., Kanagawa, E., Takaki, E., Fujimoto, M., Nakai, A., & Yamashita, H. (2016). A study of hearing function and histopathologic changes in the cochlea of the type 2 diabetes model Tsumura Suzuki obese diabetes mouse. *Acta Oto-Laryngologica*, *136*(11), Article 11. <https://doi.org/10.1080/00016489.2016.1195012>
- Ullman-Culleré, M. H., & Foltz, C. J. (1999). Body condition scoring : A rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Laboratory Animal Science*, *49*(3), Article 3.
- Urano, F. (2016). Wolfram Syndrome : Diagnosis, Management, and Treatment. *Current Diabetes Reports*, *16*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s11892-015-0702-6>
- Van Niekerk, G., Christowitz, C., Conradie, D., & Engelbrecht, A.-M. (2020). Insulin as an immunomodulatory hormone. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *52*, 34-44. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.11.006>
- Vasilyeva, O. N., Frisina, S. T., Zhu, X., Walton, J. P., & Frisina, R. D. (2009). Interactions of hearing loss and diabetes mellitus in the middle age CBA/CaJ mouse model of presbycusis. *Hearing Research*, *249*(1-2), Article 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2009.01.007>

- Vavra, J. J., Deboer, C., Dietz, A., Hanka, L. J., & Sokolski, W. T. (1959). Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiotics Annual*, 7, 230-235.
- Ventura-Sobrevilla, J., Boone-Villa, V. D., Aguilar, C. N., Román-Ramos, R., Vega-Avila, E., Campos-Sepúlveda, E., & Alarcón-Aguilar, F. (2011). Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 54, 5-9.
- Walsh, M. E., Sloane, L. B., Fischer, K. E., Austad, S. N., Richardson, A., & Van Remmen, H. (2015). Use of Nerve Conduction Velocity to Assess Peripheral Nerve Health in Aging Mice. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 70(11), Article 11. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu208>
- Walton, J. P., Barsz, K., & Wilson, W. W. (2008). Sensorineural Hearing Loss and Neural Correlates of Temporal Acuity in the Inferior Colliculus of the C57bl/6 Mouse. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s10162-007-0101-z>
- Wang, B., Chandrasekera, P., & Pippin, J. (2014). Leptin- and Leptin Receptor-Deficient Rodent Models : Relevance for Human Type 2 Diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.2174/1573399810666140508121012>
- Warshauer, J. T., Bluestone, J. A., & Anderson, M. S. (2020). New Frontiers in the Treatment of Type 1 Diabetes. *Cell Metabolism*, 31(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.017>
- Wilson, G. L., & Leiter, E. H. (1990). Streptozotocin Interactions with Pancreatic β Cells and the Induction of Insulin-Dependent Diabetes. In T. Dyrberg (Éd.), *The Role of Viruses and the Immune System in Diabetes Mellitus* (Vol. 156, p. 27-54). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-75239-1_3
- Wong, A. C. Y., & Ryan, A. F. (2015). Mechanisms of sensorineural cell damage, death and survival in the cochlea. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00058>

- Wu, K. K., & Huan, Y. (2007). Diabetic atherosclerosis mouse models. *Atherosclerosis*, 191(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.030>
- Wu, Y., Ding, Y., Tanaka, Y., & Zhang, W. (2014). Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention. *International Journal of Medical Sciences*, 11(11), Article 11. <https://doi.org/10.7150/ijms.10001>
- Yang, C. J., Lee, J.-W., & Chung, J. W. (2015). Influences of Diabetes on Hearing Recovery in Noise-Exposed Mice. *Journal of Audiology and Otology*, 19(3), Article 3. <https://doi.org/10.7874/jao.2015.19.3.138>
- Youn, C., Jun, Y., Jo, E., & Cho, S. (2020). Age-Related Hearing Loss in C57BL/6J Mice Is Associated with Mitophagy Impairment in the Central Auditory System. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/ijms21197202>
- Yu, Q., Li, J., Dai, C., Li, H., Iqbal, K., Liu, F., & Gong, C.-X. (2020). Anesthesia with sevoflurane or isoflurane induces severe hypoglycemia in neonatal mice. *PLOS ONE*, 15(4), Article 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231090>
- Zhang, Y. P., Mei, S., Yang, J., Rodriguez, Y., & Candiotti, K. A. (2016). Acute Hypoglycemia Induces Painful Neuropathy and the Treatment of Coenzyme Q10. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2016/4593052>
- Zheng, Q. Y., Johnson, K. R., & Erway, L. C. (1999). Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. *Hearing Research*, 130(1-2), Article 1-2. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(99\)00003-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(99)00003-9)

Résumé

Contexte : Actuellement, le diabète et la perte d'audition sont deux problèmes majeurs de santé publique chez les adultes dans le monde entier. Le diabète peut entraîner de graves complications qui touchent plusieurs systèmes physiologiques, comme les maladies cardiovasculaires ou la neuropathie périphérique/végétative. Il a été montré que les patients diabétiques de type 1 ou de type 2 ont une plus grande prévalence d'être atteints d'une perte auditive par rapport à des personnes non-diabétiques. Cette perte auditive causée par une hyperglycémie pathologique peut être d'origine vasculaire (microangiopathie diabétique) ou neurale (dégénérescence du nerf auditif). Des modèles animaux diabétiques ont été créés pour caractériser les mécanismes sous-tendant de cette atteinte auditive. L'objectif de cette thèse est d'examiner, chez deux souches de souris, si le diabète a un impact sur la fonction auditive et si ses conséquences sont d'origine vasculaire ou neurale sur la fonction auditive périphérique et centrale. **Matériel et méthodes** : Deux souches de souris ont été utilisées, toutes deux âgées de 5 semaines au début de l'étude, et suivies pendant 12 semaines après l'induction du diabète à l'aide d'une forte dose de streptozotocine (STZ, 200mg/kg). La souris C57Bl/6JRj, connue pour développer une perte auditive précoce liée à l'âge (à partir de 2 mois), et la souris CBA/JRj, dont la fonction auditive est stable sur près de 2 ans. Pour chaque souche, des groupes d'animaux traités et témoins ont été phénotypés pour évaluer l'apparition du diabète : glycémie, poids corporel et neuropathie périphérique (vitesse de conduction nerveuse). Parallèlement à ce suivi, une évaluation de l'audition a également été réalisée : soit via la mesure des produits de distorsion des otoémissions acoustiques (PDA), soit via la mesure des potentiels évoqués auditifs précoces (PEAp) et de latence moyenne (PEAlm), à différentes fréquences : 8, 10, 16, 24 kHz et à différents moments : 0, 4, 8, 12 semaines après l'induction. Une analyse histologique a été effectuée sur des coupes de cochlée des animaux. **Résultats** : Au cours des 12 semaines de suivi (après l'injection de STZ), et en comparaison avec le groupe témoin, le diabète s'est développé chez les deux souches de souris et est associée à des caractéristiques typiques : hyperglycémie, légère diminution du poids corporel, diminution de la conduction neurale. Une perte auditive dans les hautes fréquences a été clairement démontrée et de manière plus significative chez les souris C57Bl/6JRj diabétiques, avec une augmentation des seuils auditifs (PDA, PEA) et des changements dans la morphologie de l'onde I des PEA et une diminution des neurones du ganglion spiral. Aucune complication auditive (PDA, PEA) n'a été identifiée chez les souris CBA/JRj diabétiques. Cependant, une augmentation de la latence des ondes PEAlm a été observée. **Conclusion** : Cette étude a permis de montrer que le diabète a un impact sur la fonction auditive avec des atteintes vasculaires et neurales dans la souche C57Bl/6JRj. Cette étude n'a pas révélé d'altération de la fonction auditive périphérique chez les souris CBA/JRj diabétique mais a révélé une atteinte de la fonction auditive centrale par une neuropathie auditive.

Le rapport signal/bruit

Mots-clés : diabète, audition, souris, neuropathie, microangiopathie, électrophysiologie auditive

Abstract

Background: Diabetes and hearing loss are currently two major public health problems among adults worldwide. Diabetes can lead to serious complications affecting several physiological systems, such as cardiovascular disease or peripheral/vegetative neuropathy. Patients with type 1 or type 2 diabetes have been shown to have a higher prevalence of hearing loss than non-diabetics. This hearing loss caused by pathological hyperglycemia may be vascular (diabetic microangiopathy) or neural (auditory nerve degeneration) in origin. Diabetic animal models have been developed to characterize the mechanisms underlying this auditory damage. The aim of this thesis is to examine, in two strains of mice, whether diabetes has an impact on auditory function and whether its consequences are of vascular or neural origin on peripheral and central auditory function. Material and methods: Two strains of mice were used, both 5 weeks old at the start of the study, and followed for 12 weeks after induction of diabetes using a high dose of streptozotocin (STZ, 200mg/kg). The C57Bl/6JRj mouse, known to develop early age-related hearing loss (from 2 months of age), and the CBA/JRj mouse, whose hearing function is stable over nearly 2 years. For each strain, groups of treated and control animals were phenotyped to assess the onset of diabetes: blood glucose, body weight and peripheral neuropathy (nerve conduction velocity). Parallel to this follow-up, hearing was also assessed: either via the measurement of distortion products of otoacoustic emissions (DPOAE), or via the measurement of early auditory brainstem responses (ABR) and mid-latency auditory evoked potentials (PEAlm), at different frequencies: 8, 10, 16, 24 kHz and at different times: 0, 4, 8, 12 weeks after induction. Histological analysis was performed on animal cochlea sections. Results: During the 12-week follow-up period (after STZ injection), and in comparison, with the control group, diabetes developed in both mouse strains and was associated with typical features: hyperglycemia, slight decrease in body weight, decrease in neural conduction. High-frequency hearing loss was clearly and more significantly demonstrated in diabetic C57Bl/6JRj mice, with increased auditory thresholds (DPOAE, ABR) and changes in ABR wave I morphology and a decrease in spiral ganglion neurons. No auditory complications (DPOAE, ABR) were identified in diabetic CBA/JRj mice. However, an increase in ABR wave latency was observed. Conclusion: This study showed that diabetes has an impact on auditory function, with vascular and neural damage in the C57Bl/6JRj strain. This study did not reveal any impairment of peripheral auditory function in diabetic CBA/JRj mice, but did reveal impairment of central auditory function by auditory neuropathy.

Key words: diabetes, hearing, mice, neuropathy, microangiopathy, auditory electrophysiology